



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SECUNDÁRIOS INDUZIDOS PELA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE CICLOFOSFAMIDA EM REGIME DE
QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA EM CÃES E GATOS – ESTUDO
RETROSPETIVO DE 36 CASOS**

Ana Isabel da Silva Sá

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva
Moreira

Dr. Joaquim José Garcia Pereira Henriques

ORIENTADOR

Dr. Joaquim José Garcia Pereira
Henriques

CO-ORIENTADOR

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SECUNDÁRIOS INDUZIDOS PELA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE CICLOFOSFAMIDA EM REGIME DE
QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA EM CÃES E GATOS – ESTUDO
RETROSPETIVO DE 36 CASOS**

Ana Isabel da Silva Sá

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Manuela Grave Rodeia Espada Niza

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva
Moreira

Dr. Joaquim José Garcia Pereira Henriques

ORIENTADOR

Dr. Joaquim José Garcia Pereira
Henriques

CO-ORIENTADOR

Doutora Berta Maria Fernandes
Ferreira São Braz

2016

LISBOA

Em memória da minha avó Florinda

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, ao meu irmão e toda a minha família pelo incansável apoio, por me ampararem nos meus momentos de ansiedade e de perda total de confiança. Por todo o amor que me dão sempre, por todo o orgulho que têm nas minhas vitórias, por todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim e por serem um exemplo todos os dias. Um agradecimento especial à minha mãe: obrigada pela paciência e pelas palavras sábias em todos os momentos em que me senti mais perdida.

Agradeço à minha avó Florinda, que apesar de já não estar fisicamente presente, está sempre comigo. Obrigada por teres sido a melhor pessoa do mundo, por me teres ensinado os valores mais importantes desta vida, pelo teu amor incondicional. Tenho tanta pena que não estejas cá a assistir a este momento!

Ao Dr. Joaquim Henriques agradeço, em primeiro lugar, a oportunidade que me deu ao aceitar o meu estágio curricular no Hospital Veterinário Berna. Obrigada ainda por todo o conhecimento que me transmitiu, por todos os ensinamentos, pelas oportunidades, por toda a confiança, paciência, amabilidade, motivação e apoio constantes. É um grande exemplo para mim e estou-lhe grata por tudo.

À professora Berta São Braz por ter aceitado ser minha co-orientadora e por ter sido sempre um apoio ao longo desta caminhada. Agradeço-lhe a disponibilidade, os conselhos, os esclarecimentos, a ajuda e ainda a sua preciosa contribuição, não só para esta dissertação, mas também na minha formação.

A toda a equipa do Hospital Veterinário Berna: Dra. Ana Ribeiro, Dra. Inês Fonseca, Dra. Inês Sousa, Dra. Joana Sousa, Dra. Patrícia Duarte, Dra. Tânia Sena, Dr. Ricardo Felisberto e Dr. Tiago Gaspar, enfermeiras Alexandra Pinto, Fátima Ferro, Joana Farinha, Liliana Sousa, Marta Fernandes e Margarida Sousa e ainda ao João Alves. Agradeço-vos todo o companheirismo, a entreatajuda, a confiança e por me fazerem sentir parte da equipa. Foram 6 meses muito especiais e estou-vos muito grata por isso.

À minha companheira de estágio, Mariana Jesus, obrigada por partilhares comigo os medos, ansiedades, experiências e conquistas.

Agradeço ainda à FMV-UL, a todo o corpo docente, assim como ao corpo clínico do Hospital Veterinário Escolar, por me terem proporcionado uma formação de excelência.

Aos meus amigos de sempre e para sempre, os que estão sempre lá, mesmo longe. O meu tesouro: Carla Lavado, Carla Costa, Paula Gomes, Raquel Forte, João Araújo e Sérgio Pimenta.

Aos amigos que descobri ao longo destes 6 anos e sem os quais este percurso tinha sido muito mais difícil e com certeza muito menos divertido: Fogaça, Domingues, André, Marina, Diogo, Susana, Sónia, Mariana, Gomes e Neves. Obrigada por tudo, tudo, tudo! Ter cometido esta loucura de tirar outro curso valeu muito mais apenas só por vos ter conhecido.

Aos meus cães Pluto, Tulipa, Kika e Cookie. Obrigada por me motivarem e por contribuírem para a minha paixão por esta profissão.

E porque os últimos são os primeiros: obrigada, Morgado, amor da minha vida, meu fiel companheiro nesta luta, meu suporte emocional! Sem ti este sonho teria sido muito mais difícil de alcançar. Obrigada por acreditares sempre em mim, por teres sempre a certeza de que eu era capaz e que seria sempre a melhor versão de mim. Só eu sei tudo o que fizeste e abdicaste para eu chegar até aqui. Obrigada, meu maridão!

Resumo

Avaliação dos efeitos secundários induzidos pela administração oral de ciclofosfamida em regime de quimioterapia metronômica em cães e gatos – estudo retrospectivo de 36 casos

A quimioterapia metronômica (QM) consiste na administração de baixas doses de compostos citotóxicos, de forma contínua, sem pausa, por um longo período de tempo. O fármaco citostático mais utilizado em QM é a ciclofosfamida (CIC). Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos adversos induzidos pela QM com CIC, administrada por via oral, em cães e gatos, diagnosticados com neoplasias malignas, através da caracterização dos efeitos secundários manifestados. Incluíram-se todos os cães e gatos, machos e fêmeas, submetidos a tratamento quimioterápico de neoplasias malignas espontâneas, com doses baixas de CIC, tanto em monoterapia como em terapia combinada (meloxicam, piroxicam e toceranib) no Hospital Veterinário Berna, desde de março de 2014 a março de 2016. Verificou-se que 26 em 36 animais ocorreu pelo menos um efeito adverso relacionado com a QM, correspondente a 72,2% da amostra. Foram observados 101 efeitos adversos, o que correspondeu a 40 episódios de toxicidade gastrointestinal, 30 de mielotoxicidade, 16 de toxicidade hepática, 13 de toxicidade renal e 2 de cistite hemorrágica estéril. Em 18 animais observou-se a ocorrência de mais do que um efeito secundário em simultâneo, ao longo do tratamento, correspondendo a 50% da amostra. No que diz respeito à gravidade dos episódios observados, a maioria destes foram ligeiros, de acordo com o *Veterinary cooperative group – common terminology criteria for adverse events* (VCOG-CTCAE, 2011), dado que 60,4% dos episódios classificaram-se em grau 1 e 27,72% em grau 2. Apenas a 8,91% e 2,97% dos episódios foi atribuída a classificação em graus 3 e 4, respetivamente.

Palavras-chave: Quimioterapia metronômica, ciclofosfamida, toxicidade, efeitos secundários.

Abstract

Clinical profile evaluation of toxicity after oral administration of cyclophosphamide in metronomic chemotherapy regimen in dogs and cats - retrospective study of 36 cases

The metronomic chemotherapy (MC) consists in the administration of cytotoxic drugs, continuously, without interruption, using doses lower than those conventionally used. The most widely used cytostatic drug, in MC, is cyclophosphamide (CYC). This study aimed to evaluate the clinical presentation of toxicity induced by the MC with CYC, orally administered in dogs and cats diagnosed with malignant neoplasms, through the characterization of the manifested side effects. In this study were included all cats and dogs, males and females, from Hospital Veterinário Berna, since March 2014 until March 2016, undergoing chemotherapy treatment of spontaneous malignancies with low doses of CYC, either solely or in combination with other drugs (meloxicam, piroxicam and toceranib). It was found that 26 out of 36 animals experienced at least one episode of toxicity associated with MC, corresponding to 72.2% of the animals. 101 events of toxicity were observed, which corresponded to 40 episodes of gastrointestinal toxicity, 30 of myelotoxicity, 16 of hepatotoxicity, 13 of nephrotoxicity and 2 of sterile hemorrhagic cystitis. In 18 animals more than one event of toxicity occurred simultaneously, throughout the treatment, corresponding to 50% of the animals. With regard to the severity of the adverse events observed, most of them were mild in accordance with Veterinary Cooperative Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE VCOG - 2011), once 60.4% of the events were classified in grade 1 and 27.72 % in grade 2. Only 8.91 % and 2.97 % of the episodes were classified as grades 3 and 4, respectively.

Key-words: Metronomic chemotherapy, cyclophosphamide, toxicity, side effects.

Índice

I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Introdução	4
1.1. O cancro em animais de companhia	4
2. Da Quimioterapia Convencional à Quimioterapia Metronómica	5
3. O microambiente tumoral.....	9
4. Biologia Tumoral	11
4.1. Autosuficiência em sinais de crescimento celular	12
4.2. Insensibilidade aos Sinais Inibidores do Crescimento.....	13
4.3. Capacidade de Evasão à Apoptose.....	14
4.4. Potencial Replicativo Ilimitado	14
4.5. Indução de Angiogénese Sustentada	16
4.6. Capacidade de Invasão de Tecidos e de Metastização	17
5. Quimioterapia Metronómica vs Quimioterapia Convencional	19
5.1. Vantagens e Desvantagens da utilização da Quimioterapia Metronómica	21
6. Mecanismo de ação dos fármacos utilizados em Quimioterapia Metronómica	21
6.1. Atividade Anti-Angiogénica.....	23
6.2. Modulação do Sistema Imunitário	26
7. Indicações Clínicas para a realização de Quimioterapia Metronómica	28
8. Fármacos utilizados em Quimioterapia Metronómica.....	31
8.1. Ciclofosfamida	31
8.2. Clorambucilo	32
8.3. Lomustina	33
8.4. Anti-inflamatórios Não Esteróides	35
8.5. Inibidores dos Recetores de Tirosina-Cinase	37
9. Utilização segura de fármacos citotóxicos	38
10. Efeitos Secundários da Quimioterapia Metronómica com Ciclofosfamida	38
10.1. Toxicidade Hematopoiética.....	40
10.2. Toxicidade Gastrointestinal.....	41
10.3. Toxicidade Hepática	42
10.4. Toxicidade Renal	42
10.5. Cistite Hemorrágica Estéril.....	43
11. Classificação dos efeitos secundários	45
III. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SECUNDÁRIOS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE CICLOFOSFAMIDA EM REGIME DE QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA EM CÃES E GATOS – ESTUDO RETROSPETIVO DE 36 CASOS	48
1. Objetivo	48
2. Materiais e Métodos.....	48
2.1. Critérios de Inclusão	49
2.2. Critérios de Exclusão.....	49
2.3. Parâmetros em análise	49
2.4. Classificação dos efeitos secundários	50
3. Análise Estatística.....	51
4. Resultados	52

4.1. Caracterização da amostra	52
4.2. Distribuição de frequências dos efeitos secundários	56
1.1.1. Toxicidade Gastrointestinal.....	58
1.1.2. Toxicidade Hematopoiética.....	60
1.1.3. Toxicidade Hepática	62
1.1.4. Toxicidade renal	63
1.1.5. Cistite Hemorrágica Estéril	64
5. Ocorrência de efeitos secundários em função do protocolo e dose utilizados	64
6. Relação entre a ocorrência de efeitos secundários e o protocolo utilizado	65
7. Relação entre a ocorrência de efeitos secundário e a realização prévia de protocolos com DMT.....	66
8. Discussão	67
9. Conclusão	75
BIBLIOGRAFIA	77
ANEXOS	93
Anexo 1 - Comunicação em painel realizada no XII Congresso Hospital Veterinário Montenegro – Oncologia Sem Segredos.....	93
Anexo 2 - Descrição dos dois casos clínicos de Cistite Hemorrágica Estéril	94

Índice de figuras

Figura 1 – Representação, à esquerda, da perspectiva reducionista do cancro e à direita a representação da visão atual da complexidade tumoral e do seu microambiente (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).....	10
Figura 2 – Representação das principais características adquiridas pelas células durante o processo de carcinogénese (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).....	12
Figura 3 – Características adquiridas emergentes, evasão ao sistema imunitário e a reprogramação do metabolismo energético. Características que propiciam o cancro, a instabilidade genómica e a inflamação (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).....	18
Figura 4 – A diferença de conceito entre a quimioterapia com DMT e a quimioterapia metronómica (Adaptado de Upreti <i>et al</i> , 2013).....	20
Figura 5 – Alvos múltiplos da quimioterapia metronómica (Adaptado de Pasquier et al., 2010).	22
Figura 6 – Etapas do “switch” angiogénico (Adaptado de Bergers & Benjamin, 2003).	23
Figura 7 – Teoria explicativa da ação da quimioterapia metronómica. Pode observar-se um modelo esquemático do tumor e do seu microambiente. a) Antes da quimioterapia metronómica. b) Depois da ação da quimioterapia metronómica (Adaptado de Pasquier et al., 2010).....	25
Figura 8 – CSCs como parte do microambiente tumoral (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).....	28
Figura 9 – Mecanismo de ação do protocolo de C-S nos perócitos e células endoteliais (Adaptado de Pietras & Hannahan, 2005).	30

Índice de imagens

Imagem 1 – Imagem ecográfica da bexiga da doente com um espessamento de cerca de 2 mm.	94
Imagem 2 – Imagem ecográfica da bexiga da doente com um espessamento de cerca de 1 cm.	95
Imagem 3 - Imagem obtida por uretrocistoscopia, na qual se observa a mucosa vesical com sinais de hiperplasia, descamação e erosões hemorrágicas, compatíveis com o diagnóstico de cistite hemorrágica.....	95
Imagem 4 - Imagem obtida por uretrocistoscopia em que se visualiza a região apical da bexiga com alterações mais exuberantes.....	96
Imagem 5 – Hematúria da cadela com CHE, grau 2.	97

Índice de tabelas

Tabela 1 – Estudos com recurso à utilização de quimioterapia metronómica em Medicina Veterinária.	8
Tabela 2 – Inibidores dos recetores de tirosina-cinase utilizados em medicina veterinária (Adaptado de London, 2009).....	38
Tabela 3 – Classificação, em graus, da toxicidade hematopoiética (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).....	45
Tabela 4 – Classificação, em graus, da toxicidade hepática e renal (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).....	46
Tabela 5 – Classificação, em graus, da toxicidade gastrointestinal (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).....	46
Tabela 6 – Classificação, em graus, da cistite hemorrágica estéril (adaptado de VCOG-CTCAE).....	47
Tabela 7 – Valores sanguíneos para referência na avaliação da toxicidade hematopoiética, hepatotoxicidade e toxicidade renal, na amostra em estudo.....	50
Tabela 8 – Frequência relativa e absoluta dos efeitos secundários observados.	56
Tabela 9 – Frequência relativa e absoluta dos efeitos secundários observados pelo grau de classificação atribuído.	57
Tabela 10 – Efeitos secundários observados em simultâneo no mesmo animal e respetiva frequência relativa e absoluta.	58
Tabela 11 – Frequência absoluta do número de animais que desenvolveram efeitos secundários de acordo com o protocolo de QM utilizado e com o tipo de toxicidade induzida.	65
Tabela 12 – Significância estatística da associação entre a ocorrência de efeitos secundários e o protocolo de QM, pelo teste de Qui- Quadrado, com correção de Yates	65
Tabela 13 – Significância estatística da associação entre a ocorrência de efeitos secundários e a dose de CIC utilizada em monoterapia, pelo teste de Qui- Quadrado, com correção de Yates	66
Tabela 14 – Significância estatística da associação entre a ocorrência de efeitos secundários e a realização prévia de protocolos com DMT, pelo teste de Qui- Quadrado, com correção de Yates.	66

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Presença de metástases na amostra (n=36).....	52
Gráfico 2 – Localização das metástases.	52
Gráfico 3 – Frequência relativa da distribuição do tipo de neoplasia nos cães da amostra em estudo (n=25).....	53
Gráfico 4 – Frequência relativa da distribuição do tipo de neoplasia nos gatos da amostra em estudo (n=11).....	54
Gráfico 5 – Frequência relativa de utilização dos diferentes protocolos de QM, em toda a amostra.	54
Gráfico 6 – Frequência absoluta de cães que foram submetidos aos diferentes protocolos de QM.....	55
Gráfico 7 – Frequência absoluta de gatos que foram submetidos aos diferentes protocolos de QM.....	55
Gráfico 8 – Frequência absoluta dos episódios de toxicidade gastrointestinal e respetiva gravidade, de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.	59
Gráfico 9 – Frequência absoluta dos episódios de toxicidade gastrointestinal e respetiva gravidade, de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães da amostra.....	59
Gráfico 10 – Frequência absoluta dos episódios de toxicidade gastrointestinal e respetiva gravidade, de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos gatos da amostra.	60
Gráfico 11 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hematopoiética e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.....	61
Gráfico 12 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hematopoiética e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães da amostra.	61
Gráfico 13 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hematopoiética e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos gatos da amostra.....	62
Gráfico 14 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hepática e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.	62
Gráfico 15 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hepática e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães e gatos da amostra, separadamente.	63
Gráfico 16 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade renal e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.	63
Gráfico 17 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade renal e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães e gatos da amostra, separadamente.	64

Lista de Abreviaturas

AINE – Anti-inflamatório Não Esteróide

AINEs - Anti-inflamatórios Não Esteróides

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ALT – Alanina aminotransferase

ARN – Ácido Ribonucleico

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina Trifosfato

BID – Administrar a cada 12 horas

CEPs – Células progenitoras endoteliais

CHE – Cistite Hemorrágica Estéril

CHOP – Ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona

CIC – Ciclofosfamida

COX-1 – Ciclo-oxigenase 1

COX-2 – Ciclo-oxigenase 2

C-S – *Chemo-switch*

CSCs – *Cancer stem cells*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMT – Dose Máxima Tolerada

EOD – *Every other day*

FAS – Fosfatase Alcalina

FGFb – *Basic fibroblast growth factor*

FGFR – *Fibroblast growth factor receptor*

GGT – Gama-glutamyltransferase

GI – Gastrointestinal

HVB – Hospital Veterinário Berna

IFN- γ – Interferão- gama

IL-10 – Interleucina-10

IL-2 – Interleucina-2

MDSCs – *Myeloid-derived suppressor cells*

MESNA – Ácido 2-2-mercaptoetanosulfonato

MMPs – *Matrix metalloproteinases*

MO – Medula Óssea

NK – *Natural Killer*

NO – Óxido nítrico

PDGF – *Platelet-derived growth factor*

PDGFR – *Platelet-derived growth factor receptors*

PGE2 – Prostaglandina E2

PO – Via oral

p-value – Probabilidade de significância

QC – Quimioterapia Convencional

QM – Quimioterapia Metronómica

RLOS – Radicais livres de oxigénio

RTCs – Recetores de tirosina-cinase

SID – Administrar a cada 24 horas

t_{1/2} – Tempo de semivida biológico

TGF α – *Tumor growth factor alpha*

TGF- β – *Transforming growth factor beta*

TKIs – Inibidores dos recetores de tirosina-cinase

TSP-1 – Trombospondina-1

Tregs – Células T reguladoras

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR – *Vascular endothelial growth factor receptor*

VCOG-CTCAE – *Veterinary cooperative group – common terminology criteria for adverse events*

I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

O estágio curricular decorreu no Hospital Veterinário Berna (HVB), em Lisboa, no período de 1 de setembro de 2015 a 26 de fevereiro de 2016, com uma carga horária total de cerca de 1040 horas, na área de clínica de animais de companhia, com ênfase em oncologia veterinária.

Durante o estágio, a autora frequentou os diversos serviços do hospital, entre eles, Medicina Interna, Cardiologia, Imagiologia, Anestesia, Cirurgia, Patologia Clínica e Internamento, realizando turnos rotativos de 8 horas em todos os serviços, excetuando o Internamento cujos turnos eram de 10 horas.

Na área de Medicina Interna, a autora assistiu a consultas gerais, nas quais foi possível a participação ativa na elaboração da anamnese, exame do estado geral, lista de diagnóstico diferenciais, plano de diagnóstico e terapêutica a instituir. A autora teve a possibilidade de executar ou auxiliar a execução de vários procedimentos tais como: colheita de sangue, realização de análises clínicas e interpretação das mesmas (hemograma completo, bioquímicas, ionograma, microhematócrito), utilização do refratómetro para determinação de densidade urinária e proteínas totais séricas, realização de exames completos de urina, venopunção para colocação de catéter e sistema de venoclise, medição da glicémia, drenagem de líquido de derrames cavitários, algaliação, realização de punções aspirativas por agulha fina, limpeza de feridas, administração de medicamentos (via oral, endovenosa, intramuscular e subcutânea), imunização, medição da pressão arterial, teste de fluoresceína, teste de Schirmer, preparação e administração de quimioterápicos, observação ao microscópio ótico de lâminas de citologia e de esfregaços sanguíneos, remoção de pontos simples, realização de pensos simples e pensos gordos, realização de electrocardiograma, entre outros.

Para além das consultas de clínica geral, a autora assistiu também a consultas de especialidade – oncologia, oftalmologia, neurologia, ortopedia, dermatologia e cardiologia. Sendo o HVB um local de referência em oncologia veterinária, durante o estágio houve um maior predomínio de consultas de especialidade nesta área. Assim sendo, a aluna participou em inúmeras consultas da área e nas sessões de quimioterapia, que incluíam a receção dos animais, colocação de catéteres, colheita de sangue para análises sanguíneas, administração dos fármacos e esclarecimento de dúvidas dos proprietários sobre cuidados especiais a ter com os animais tratados.

A área de imagiologia incidiu sobre os seguintes serviços: radiologia e ecografia (abdominal e ecocardiografia), onde a aluna teve a oportunidade de participar no posicionamento e contenção dos doentes, na realização e na interpretação dos exames.

No bloco cirúrgico, a autora acompanhou os doentes antes, durante e após as cirurgias, realizando a avaliação pré-cirúrgica, preparando o doente (colocação de catéter, intubação endotraqueal, tricotomia, desinfecção e limpeza da zona sujeita à incisão), administrando a pré-medicação e a indução anestésica, preparando o material cirúrgico e os aparelhos de monitorização anestésica (eletrocardiograma, frequência cardíaca, pressão arterial, pulsoximetria), monitorizando a anestesia, auxiliando durante a cirurgia e, no recobro desta, efetuando as avaliações e os cuidados pós-cirúrgicos.

Durante as cirurgias, a aluna teve a oportunidade de desempenhar as funções de anestesista, ajudante de cirurgião, cirurgião (realização de orquiectomias eletivas de gatos) e circulante, consoante a requisição do cirurgião responsável. As cirurgias assistidas durante o estágio foram várias, nomeadamente ovariohisterectomias eletivas e devido a piómetras, orquiectomias eletivas (cães e gatos) ou relacionadas com doença prostática no caso dos cães, resolução de dilatação gástrica, cistotomia para remoção de cálculos, resolução de hérnia perineal, remoção de corpo estranho linear por enterotomia, resolução de fístula oronasal, destartarizações e extrações dentárias e cirurgias oncológicas (remoção de diferentes tipos de tumores, mastectomias, adrenelectomia, esplenectomias, ressecção da cabeça do fémur devido a processo neoplásico, realização de biópsias de osso bem como de outras lesões – orais, nódulos cutâneos – e ainda biópsia de linfonodos para diagnóstico de linfoma, entre outras). Foi possível assistir e auxiliar noutras terapias realizadas no HVB, no tratamento de doentes oncológicos, como a eletroquimioterapia, terapia fotodinâmica, imunoterapia, laser e crioterapia. Foram ainda visualizadas algumas cirurgias por mínima invasão como endoscopias, broncoscopias, toracoscopias, rinoscopias, laparoscopias e ovariectomias eletivas.

Na área de Internamento foram prestados cuidados de higiene e alimentação aos doentes internados, foram administradas medicações, consoante as suas necessidades individuais e atendendo sempre à sua evolução clínica, e foram realizados procedimentos semelhantes aos efetuados nas consultas. Durante o turno de Internamento, a aluna tinha a seu cargo a monitorização dos sinais vitais, tais como: cor das mucosas, tempo de repleção capilar, pulso, frequências cardíaca e respiratória, e temperatura corporal. A aluna era igualmente responsável pela limpeza das jaulas e pelo passeio dos doentes no exterior.

No local de estágio, realiza-se uma vez por semana, na parte da manhã, um *Journal Club*, onde médicos veterinários e estagiários de medicina veterinária fazem uma apresentação sobre um tema previamente definido, sendo posteriormente realizada uma breve discussão sobre o assunto e partilhadas ideias e experiências acerca de casos clínicos recentes e anteriores, relacionados com o tema em questão. A aluna teve a oportunidade de ser a responsável por um

dos dias de *Journal Club*, tendo realizado uma apresentação acerca de cistite idiopática felina/síndrome de Pandora.

Para a aluna, o período de estágio realizado no HVB foi de suma importância na sua formação, tanto a nível científico como a nível técnico e pessoal. Foi, sem dúvida, uma experiência enriquecedora, uma vez que permitiu a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do percurso académico, possibilitando a aplicação prática desses conhecimentos em situações reais, bem como a aquisição extensa de novos conhecimentos, com ênfase, na área de oncologia veterinária. Permitiu ainda a prática de vários procedimentos essenciais e que fazem parte do dia-a-dia do médico veterinário.

Quanto à escolha do tema da dissertação, “Avaliação dos efeitos secundários induzidos pela administração oral de ciclofosfamida em regime de quimioterapia metronómica em cães e gatos – estudo retrospectivo de 36 casos”, foram tidos em conta diversos fatores, nomeadamente, o interesse da aluna pela área da oncologia veterinária; o fato de ser cada vez mais comum a realização deste modelo de quimioterapia em animais de companhia na prática clínica e de ainda não se encontrarem bem estudadas as suas consequências quer a nível hematopoiético, renal, hepático e gastrointestinal. Para além disso, a existência, no HVB, da especialidade de oncologia, a possibilidade da realização de quimioterapia metronómica como forma de tratamento dos animais com doenças neoplásicas bem como a elevada casuística relativamente à administração de quimioterapia em regime metronómico, contribuíram para a recolha rápida de um número de casos suficiente para a elaboração do estudo e da dissertação.

Alguns dos resultados obtidos durante a execução do trabalho desenvolvido nesta dissertação de mestrado foram apresentados no seguinte encontro científico (Anexo 1):

- Sá, A.; Gaspar, T.B.; Felisberto, R.; São Braz, B.; Henriques, J. (2016) – Avaliação da Toxicidade Hematopoiética, Renal e Hepática devida a Quimioterapia Metronómica com Ciclofosfamida. XII Congresso Hospital Veterinário Montenegro – Oncologia Sem Segredos. Organizado pelo Hospital Veterinário Montenegro, no Europarque. Decorreu em Sta. Maria da Feira, nos dias 20 e 21 de fevereiro de 2016. Comunicação em painel.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução

1.1. O cancro em animais de companhia

O cancro nos animais tornou-se um verdadeiro desafio para toda a comunidade de médicos veterinários, sejam estes clínicos ou investigadores. A prevalência desta doença tem aumentado significativamente nos últimos anos particularmente devido ao desenvolvimento da medicina preventiva e ao aumento da longevidade dos animais (Pierini, Bocci, Giorgi, Owen & Marchetti, 2012; Withrow, Dail & Page, 2013).

Atualmente, face ao fato de os proprietários de pequenos animais revelarem mais conhecimentos e maiores exigências no tratamento, e sobretudo, devido a uma ligação afetiva Homem-animal cada vez mais forte, verifica-se um aumento da procura de todos os meios existentes para aumentar a longevidade e a qualidade de vida dos animais de companhia. Tal procura reflete-se numa melhor nutrição, em melhores cuidados de higiene, na realização de programas de vacinação adequados, em cuidados de desparasitação e de prevenção de doenças parasitárias, bem como em melhores práticas médicas de rastreio, prevenção e tratamento de várias doenças.

Como consequência, a esperança média de vida dos animais aumentou, o que culminou numa maior suscetibilidade ao aparecimento de doenças relacionadas com a idade (Paoloni & Khanna, 2007). Assim, na atualidade, surgem ao clínico um conjunto de doenças que antigamente não seriam tão predominantes, tais como as doenças dos foros cardíaco, renal e neoplásico (Crump, 2013).

Assim, o cancro é, de uma forma geral, uma doença do animal idoso, existindo inúmeros estudos que apontam a doença como uma das principais causas de morte em animais de companhia. Estima-se que 25% dos doentes caninos com mais de dois anos de idade (Paoloni & Khanna, 2007) e 45% dos cães com dez ou mais anos de idade, irão morrer devido a um processo oncológico (Withrow et al., 2013). Outros estudos revelam que um em cada quatro cães e gatos irá morrer vítima de uma neoplasia e ainda que 30% dos cães virá a desenvolver uma neoplasia (Brønden, Rutteman, Flagstad & Teske, 2003; Dobson, 2010). Demonstrou-se também que, em 23% dos animais sujeitos a necrópsia, a causa provável de morte foi a presença de um tumor (Withrow, Dail & Page, 2013).

Nos capítulos 2 e 3 desta dissertação irá descrever-se a origem e as principais características da quimioterapia metronómica (QM) bem como o conceito de microambiente tumoral e a sua importância. Considerou-se relevante a realização desta abordagem dada a interligação

existente entre a QM e o microambiente tumoral, uma vez que parte da eficácia desta modalidade terapêutica assenta na sua interação com este microambiente.

2. Da Quimioterapia Convencional à Quimioterapia Metronômica

A era da quimioterapia, iniciada a meio do século passado, tem sido dominada por protocolos em que são utilizados fármacos anti-neoplásicos, baseando-se no conceito de dose máxima tolerada (DMT) pelo doente (Farber et al., 1948).

A explicação para a quimioterapia utilizando a DMT, baseia-se em grande parte, nos trabalhos realizados por Skipper e colegas (1970), nos quais estes investigadores demonstraram que a morte das células tumorais aumentava proporcionalmente à concentração do quimioterápico utilizado. Então, em teoria, quanto maior a dose administrada do composto anti-neoplásico, maior será a probabilidade de se erradicar totalmente o tumor, aumentando assim o potencial de cura (Skipper et al., 1970).

O limite para a dose a ser administrada é a ocorrência de efeitos tóxicos nos tecidos saudáveis, visto que, as células mais afetadas são aquelas que se dividem continuamente, como as células localizadas na medula óssea e no trato gastrointestinal. Como a utilização da DMT está muitas vezes associada a toxicidade elevada, são necessários períodos de intervalo entre os ciclos de tratamento, durante os quais pode ocorrer desenvolvimento/re-população do tumor ou aquisição de resistência aos fármacos (Scharovsky, Mainetti & Rozados, 2009). No entanto, devido ao fato de conseguirem promover um equilíbrio entre a toxicidade e o propósito de destruir o maior número possível de células tumorais, estes protocolos ocupam ainda hoje um lugar de destaque na terapêutica médica oncológica humana e veterinária. Além disto, o aumento da disponibilidade de fármacos de “suporte” em medicina veterinária que minimizam os efeitos tóxicos, tais como protetores gastrointestinais e substâncias anti-eméticas, contribuem para que o conceito de DMT continue a ser a primeira opção terapêutica.

Nas últimas décadas a oncologia veterinária passou por um progresso significativo, tendo-se baseado na investigação realizada por equipas multidisciplinares, no sentido de se compreender a oncobiologia e na tentativa de se descobrirem novas terapêuticas que proporcionem a cada doente o tratamento certo, no momento certo, à semelhança do que ocorre em Medicina Humana (Withrow et al., 2013; Collins, 2010). Desta forma, foram aparecendo ao longo do tempo várias terapias, nas quais se inclui a QM, que surge com Judah Folkman e Robert Kerbel e seus respetivos colegas (Browder, Butterfield & Kräling, 2000; Klement et al., 2000). Este grupo de investigadores conseguiu demonstrar a eficácia terapêutica de alguns dos fármacos

anti-neoplásicos mais amplamente utilizados em esquemas de DMT, quando administrados cronicamente, de forma frequente, em doses baixas.

Este novo conceito de quimioterapia permitiu a introdução da possibilidade de tratamento de tumores que já não respondiam à terapêutica tradicional (como o carcinoma do pulmão e da mama). No ano de 2000 Browder e Klement, publicaram dois estudos revolucionários onde demonstraram as vantagens da QM, ao constatarem que roedores portadores de tumores subcutâneos respondiam à QM, mesmo quando estes tinham adquirido resistência aos mesmos compostos, quando administrados de forma convencional (Browder et al., 2000; Klement et al., 2000).

Por forma a evitar os efeitos adversos causados pelos tratamentos quimioterápicos tradicionais, vários grupos de investigadores, começaram a estudar esta nova modalidade quimioterápica, a que Douglas Hanahan intitulou de terapia metronómica, tendo em conta a publicação prévia dos dois estudos pré-clínicos, já mencionados, de Klement et al. (2000) e de Browder et al. (2000), em que foram usados quimioterápicos, como a vimblastina e a ciclofosfamida (CIC), em baixas doses de forma contínua.

A escolha do termo “metronómica”, advém do esquema utilizado, que consiste na administração, a longo prazo, de baixas doses de fármacos citostáticos, sem períodos de descanso prolongados entre administrações. O termo deriva da palavra “metronomo”, relógio que mede o tempo musical através da produção de pulsos de duração regular. Outras designações definidas para esta nova abordagem são quimioterapia contínua em baixas doses ou quimioterapia anti-angiogénica (Browder et al., 2000; Mutsaers, 2007).

Desde então este tratamento tem vindo a receber uma atenção especial dos investigadores em oncologia humana e veterinária. O uso de fármacos anti-neoplásicos com os quais já estamos familiarizados, o baixo custo e a fácil administração, tornam-na uma forma terapêutica atrativa para aplicação na prática da oncologia veterinária. Com este esquema terapêutico consegue-se ainda alcançar um baixo nível de concentração sanguínea do fármaco, sem os efeitos adversos significativos da DMT, permitindo assim a eliminação de intervalos longos entre doses, durante os quais podem surgir alterações nas células tumorais como, por exemplo, o desenvolvimento de resistência aos citostáticos, já referido anteriormente (Mutsaers, 2007).

Dos vários estudos realizados em medicina veterinária, utilizando QM, pode-se referir o estudo de Lana et al. (2007), em que se avaliou em cães com hemangiossarcoma esplénico o uso de etoposido a 50 mg/m²/SID, alternado em ciclos de três semanas com ciclofosfamida entre 12,5 a 25 mg/m²/SID, por via oral (PO), juntamente com piroxicam 0,3mg/kg/SID, de forma contínua. A QM foi bem tolerada durante os seis meses de tratamento previsto e a média de sobrevida livre de progressão e o intervalo médio de sobrevida foram ambos de cento e setenta

e oito dias. No estudo de Marchetti et al. (2012), os autores testaram a administração diária da combinação de CIC a 25 mg/m² com celecoxib 2mg/kg, PO, em cães que já apresentavam metástases (Marchetti et al., 2012). Dos quinze animais tratados, um teve remissão completa (7%), e a doença foi considerada estável em cinco animais (33%). Uma fêmea com carcinoma mamário em estadio V apresentou doença estável durante seis meses e um cão com melanoma oral em estadio IV, manifestou remissão completa, beneficiando de quatro meses de sobrevida livre de doença. Existe ainda o estudo de Mitchell, Thamm & Biller (2012), que teve por objetivo determinar os efeitos do tratamento com toceranib e de CIC em baixas doses nos vários subtipos de linfócitos, incluindo células T reguladoras (Tregs), e na secreção do interferão-gama (IFN- γ), uma citocina pró-inflamatória, em canídeos com cancro. Neste estudo foram utilizados quinze animais que receberam toceranib a 2,75 mg/kg, EOD (segundas, quartas e sextas-feiras) e após quatorze dias, iniciaram a toma de CIC, por via oral a 15 mg/m²/SID. Os autores verificaram que a administração de toceranib originou uma diminuição significativa e seletiva no número e na percentagem de células Tregs e os animais que receberam toceranib e CIC, mantiveram o número de Treg baixo, após seis semanas de tratamento. Foi ainda demonstrado um aumento significativo nas concentrações séricas de IFN- γ , que está inversamente correlacionada com número de Tregs e que sugere uma potencial melhoria nos efeitos imunossupressivos nas células Tregs. Em seis dos quinze cães a doença manteve-se estável durante as oito semanas de tratamento.

Para além desses existem outros estudos em medicina veterinária, em que se utilizou a QM, que se encontram referidos na tabela 1 (Elmslie, Glawe & Dow, 2008; Burton, Mitchell, Thamm, Dow & Biller, 2011; Tripp et al., 2011; Leach et al., 2012; Schrempp et al., 2013 e Leo et al., 2014).

Tabela 1 – Estudos com recurso à utilização de quimioterapia metronómica em Medicina Veterinária.

Referência	Neoplasias	Protocolo	Toxicidade
Lana et al., 2007	Hemangiossarcoma esplénico	CIC 12,5-15 mg/m ² /SID Etoposido 50 mg/m ² /SID Piroxicam 0,3 mg/kg/SID	CHE (2 em 9 animais)
Elmslie et al., 2008	Sarcoma de Tecidos Moles	CIC 10 mg/m ² /SID Piroxicam 0,3 mg/kg/SID	CHE grau ¹ 2 (2 em 30 animais) CHE grau 4 (1 em 30 animais) Efeitos adversos ligeiros em 12 dos 30 animais
Burton et al., 2011	Sarcoma de Tecidos Moles	Grupo 1: CIC 12,5 mg/m ² /SID Grupo 2: CIC 15 mg/m ² /SID	Sem toxicidade
Tripp et al., 2011	Sarcomas Carcinomas	Lomustina 2,84 mg/m ² /SID	Efeitos adversos Grau 1 (13 episódios) Efeitos adversos Grau 2 (5 episódios) Toxicidade Gastrointestinal (30 em 81 animais) Toxicidade hepática (11 em 81 animais) Toxicidade renal (8 em 81 animais) Anemia grau 1/2 (8 em 81 animais)
Leach et al., 2012	Mastocitomas, Sarcomas de Tecidos Moles e Carcinomas	Clorambucilo 4 mg/m ² /SID	Toxicidade gastrointestinal (4 em 36 animais)
Marchetti et al., 2012	Mastocitoma, Carcinoma, Melanoma Oral	CIC 25 mg/m ² /SID Celecoxib 2mg/kg/SID	Sem toxicidade
Mitchell et al., 2012	Sarcomas, Carcinomas	CIC 15 mg/m ² /SID Toceranib 2,75 mg/kg/EOD	Toxicidade Gastrointestinal Grau 1/2 (2 em 15 animais) Trombocitopénia Grau 1 (1 em 15 animais) Neutropénia Grau 1 (1 em 15 animais) Letargia Grau 2 (2 em 15 animais)
Schrempp et al., 2013	Carcinoma das Células de Transição	Clorambucilo (4 mg/m ² /SID)	Pouca toxicidade 1 animal (1 em 31) necessitou descontinuação da terapêutica devido à toxicidade grau 3
Leo et al., 2014	Sarcomas, Carcinomas, Melanoma, Tumor neuroendócrino	CIC 14 mg/m ² (6 – 27 mg/m ²) / SID/ EOD/5x por semana/2x por semana	Anemia Grau 2 (1 em 24 animais) Trombocitopénia Grau 1 (1 em 24 animais) Toxicidade renal Grau 2 (1 em 24 animais) Toxicidade renal Grau 3 (2 em 24 animais)

CIC – Ciclofosfamida; CHE – Cistite Hemorrágica Estéril

¹ Em medicina veterinária existe um grupo, o Veterinary cooperative group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) que se dedicou ao estudo e classificação, em graus, dos efeitos secundários que ocorrem devido à administração de quimioterápicos. No ponto 9 da revisão bibliográfica desta dissertação encontra-se descrita a classificação, em graus, da toxicidade hematopoiética, renal, hepática e da cistite hemorrágica estéril, de acordo com o VCOG-CTCAE (tabelas 2,3,4 e 5). Desta forma, sempre que se descreve a classificação, em graus, de efeitos adversos observados neste e nos estudos referidos, esta encontra-se de acordo com o VCOG-CTCAE.

Numa recente revisão sistemática de oitenta estudos de fase II sobre a utilização da QM em vários tipos de tumores, em medicina humana, correspondendo a 3700 doentes, observou-se que a taxa média de resposta com esta terapêutica é de 26%, que a mediana do tempo de sobrevida livre de doença é de 4,6 meses, e que a média no controlo da doença é de 56%. Verificou-se ainda que a ocorrência de episódios de grau 3 e 4 de toxicidade foram raros. Com base nestes resultados encorajadores, nove ensaios de fase III estão atualmente registados no ClinicalTrials.gov e incluem vários cenários clínicos de utilização da QM (Lien, Georgsdottir, Sivanathan, Chan & Emmenegger, 2013).

Conclui-se assim que, aquando da entrada do novo milénio, a QM foi apresentada como uma possível alternativa à utilização da quimioterapia convencional (QC), que utiliza a DMT, trazendo consigo uma considerável mudança no paradigma da terapêutica médica oncológica. Apresenta-se como uma opção terapêutica atraente dado o seu pressuposto perfil de baixa toxicidade, baixo custo e facilidade de administração, uma vez que a maioria dos fármacos são administradas por via oral, facilitando a realização da terapêutica ambulatoria.

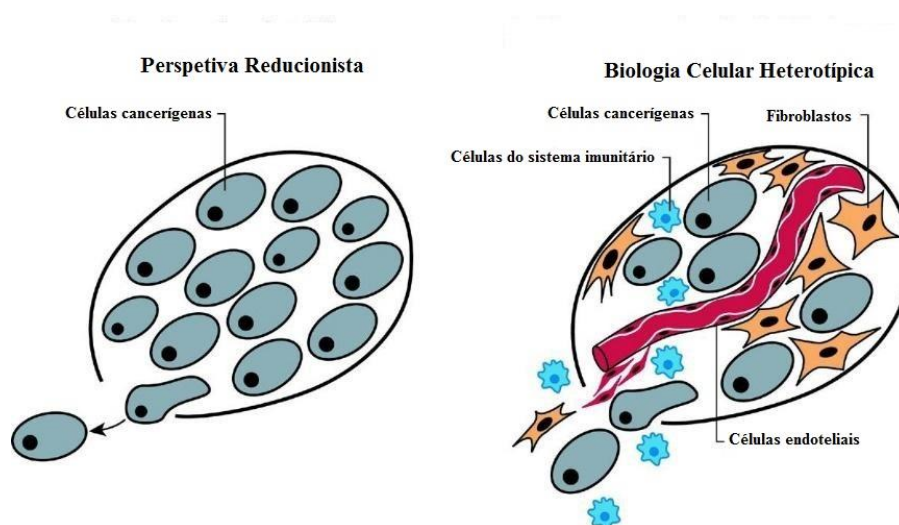
Na última década, a QM ganhou popularidade na oncologia veterinária e tornou-se uma opção frequente dos médicos veterinários e de escolha dos proprietários de animais de companhia, apesar de ainda existir uma grande lacuna no que diz respeito à avaliação sistemática da sua verdadeira eficácia, do seu perfil de toxicidade sistémica e na definição de protocolos posológicos.

3. O microambiente tumoral

Para perceber a eficácia da QM é necessário compreender outra mudança de paradigma: a QM para além de ter efeito citotóxico direto, tem demonstrado interação com o ambiente onde o tumor/células tumorais se localizam.

Na verdade, durante muito tempo apenas as células neoplásicas foram o foco de interesse na investigação sobre o cancro; a biologia do cancro era vista numa perspetiva agora considerada reducionista, onde o cancro era visto como uma doença celular (figura 1), sendo o estroma considerado como um componente reativo, sem grande importância (Hanahan & Weinberg, 2011). No entanto, nos últimos anos, a forma de olhar para um tumor mudou bastante. Atualmente, os tumores são vistos como tecidos muito complexos, capazes de ser ainda mais complexos que os tecidos normais. Neste momento, o cancro é compreendido como um sistema, integrando um tecido complexo constituído por diferentes tipos de células, que participam em interações heterotípicas, surgindo o conceito do microambiente tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

Figura 1 – Representação, à esquerda, da perspectiva reducionista do cancro e à direita a representação da visão atual da complexidade tumoral e do seu microambiente (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).



No tumor participam ou interagem vários tipos de células, como por exemplo as células endoteliais e os seus precursores, células do músculo liso, perícitos, fibroblastos, miofibroblastos, linfócitos T e B, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, basófilos, células *Natural Killer* (NK), células dendríticas, macrófagos, a interação de células do estroma com o tumor e as células estaminais cancerígenas, entre outras (Colotta, Allavena, Sica, Garlanda, & Mantovani, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011). A função que cada uma das células envolvidas neste microambiente tumoral apresenta é específica dentro do tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

Este microambiente de interações complexas inclui ainda outros fatores físico-químicos tais como a hipertensão intersticial, o baixo valor de pH extracelular, a hipóxia, a angiogénese. Todos estes fatores contribuem, de alguma forma, para que o tumor se desenvolva, prolifere e metastize para órgãos saudáveis (Polyak & Kalluri, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011).

Ultimamente, grande parte da investigação em oncologia diz respeito à interação entre as células tumorais e este microambiente, na tentativa de compreender esta complexa malha de interações e se encontrarem terapêuticas alternativas que permitam obter melhores resultados que os obtidos com as terapias oncológicas tradicionais.

O domínio do microambiente no qual a QM tem a sua maior relevância é no suprimento sanguíneo tumoral, uma vez que esta exerce a sua atividade principal ao nível da inibição da angiogénese tumoral, através da sua interação com as células endoteliais (Kerbel & Karmen, 2004). Ao condicionar a vascularização do tumor e o seu microambiente, certamente terá um impacto significativo na designada biologia tumoral.

4. Biologia Tumoral

O cancro é um dos mais graves problemas de saúde tanto do Homem como dos animais, cuja cura permanece por alcançar em grande parte dos casos, apesar de todos os avanços científicos. É encarado como uma doença heterogênea, complexa e multifatorial, cujas características, desenvolvimento e prognóstico variam de indivíduo para indivíduo (Loktionov, 2004).

De uma forma geral, o aparecimento de um processo cancerígeno deve-se à ocorrência e acumulação de mutações/lesões genéticas que permitem às células tumorais adquirirem a capacidade de crescer e de se dividir de uma forma autónoma, ultrapassando os limites normais da regulação celular (Balducci, 2007). Os tumores são vistos, na sua generalidade, como o resultado de uma multiplicação celular anormal e excessiva que tende a persistir desordenadamente, com efeitos lesivos sobre o organismo, levando na fase final, à morte do indivíduo.

Existem evidências suficientes de que as células cancerígenas estão em “diálogo” constante entre elas e com as células normais e que esse “diálogo” é determinante na progressão da doença. Contudo, o microambiente tumoral *in vivo* é profundamente complexo, uma vez que é constituído por inúmeros tipos de células e, concomitantemente, encontra-se “mergulhado” num enredado conjunto de substâncias bioquímicas, algumas das quais são as células cancerígenas que levam as células normais a produzir em seu proveito (Hanahan & Weinberg, 2000).

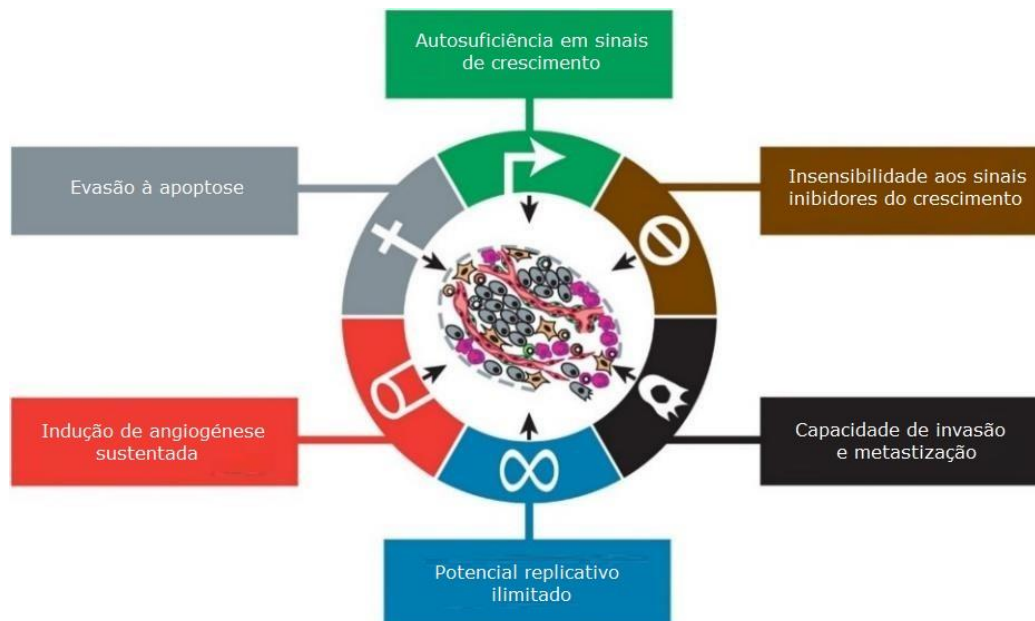
A consolidação dos conhecimentos na oncobiologia levaram a que, no ano de 2000, Hanahan e Weinberg propusessem a existência de seis alterações ou seis “características adquiridas” que ocorrem no cancro e que pretendem explicar e criar um quadro lógico universal para a compreensão da biologia do cancro (Hanahan & Weinberg, 2000). Estes autores afirmaram que os tumores são mais do que massas insulares de proliferação de células cancerígenas. Em vez disso, eles são tecidos complexos, constituídos por vários tipos celulares distintos, que participam em interações heterotípicas uns com os outros (figura 1).

Desta forma estes autores sugerem, que o vasto catálogo de genótipos de células cancerígenas são uma manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular (figura 2) que determinam de forma coletiva, o crescimento maligno. Assim se assumiu a grande mudança de paradigma sobre o modo como se concetualiza o cancro.

As seis características adquiridas pelas células durante o processo de carcinogénese, propostas por Hanahan e Weinberg (2000) são: 1) autosuficiência em sinais de crescimento; 2) insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento; 3) capacidade de evasão à morte celular

programada (apoptose); 4) potencial replicativo ilimitado; 5) indução de angiogénese sustentada e 6) capacidade de invasão de tecidos e de metastização.

Figura 2 – Representação das principais características adquiridas pelas células durante o processo de carcinogénese (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).



Cada uma destas alterações, que correspondem a novas capacidades adquiridas durante o desenvolvimento do tumor são compartilhadas pela maioria dos tumores e talvez mesmo por todos os tipos de tumores (Hanahan & Weinberg, 2000).

De seguida irá abordar-se de forma resumida cada uma destas capacidades, salientando-se os pontos considerados mais importantes, apresentados nos trabalhos de Hanahan e Weinberg (2000 e 2011).

4.1. Autosuficiência em sinais de crescimento celular

As células normais exigem a presença de sinais de crescimento, produzidos por células vizinhas, para que possam passar de um estado de repouso para um estado proliferativo ativo. Pelo que se sabe até aos dias de hoje, nenhum tipo de célula normal pode proliferar na ausência de tais sinais estimuladores (Hanahan & Weinberg, 2011).

Porém, as células tumorais mostram invariavelmente uma enorme redução na dependência de estimulação exógena para o crescimento. Para que tal ocorra, estas células desenvolveram várias estratégias que lhes permitem manter a produção de fatores proliferativos. As estratégias, até hoje descritas, são: i) a produção autócrina de fatores de crescimento e respetivos recetores membranares; ii) a indução de produção de fatores de crescimento nas células do estroma circundantes (produção parácrina), para os quais a célula neoplásica produz recetores

específicos; iii) a sobreexpressão de recetores, permitindo que a célula cancerígena se torne hiper-responsiva a uma quantidade normal de fatores proliferativos que normalmente não seriam capazes de despoletar a proliferação e iv) a ocorrência de alterações estruturais nos recetores ou vias de sinalização internas, que causam a ativação constitutiva dos mesmos (neste caso as células neoplásicas adquirem capacidade proliferativa independente de ligandos) (Lodish et al., 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

A conclusão é de que as células cancerígenas conseguem desta forma reduzir a sua dependência de estimulação exógena. Por sua vez, esta independência vai interromper um mecanismo homeostático extremamente importante, que normalmente opera para garantir um comportamento de crescimento controlado dos vários tipos de células dentro de um tecido. A produção do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*- PDGF) e do fator de crescimento do tumoral α (*tumor growth factor alpha*- TGF α), por glioblastomas e sarcomas, respetivamente, são dois exemplos ilustrativos deste fenómeno de estimulação autócrina (Hanahan & Weinberg, 2011).

4.2. Insensibilidade aos Sinais Inibidores do Crescimento

Num tecido em que há milhões de células, o controlo sobre a sua multiplicação é absolutamente necessário para que o tecido permaneça diferenciado ao longo do tempo e para que o seu equilíbrio volumétrico/espacial possa ser mantido (Hanahan & Weinberg, 2011).

Os sinais inibidores do crescimento bloqueiam a proliferação celular através de dois mecanismos distintos i) as células podem ser forçadas a sair do ciclo proliferativo ativo para o estado de repouso/quiescência (G0), a partir do qual elas podem sair numa ocasião futura, quando os sinais extracelulares o permitirem; ii) as células podem ser induzidas a abandonar permanentemente o seu potencial proliferativo, ao serem induzidas a entrar em estados pós-mitóticos, quando a divisão celular já está terminada (Hanahan & Weinberg, 2011).

Assim, para que as células neoplásicas possam multiplicar-se verdadeiramente e sem restrições, têm de ultrapassar uma segunda barreira imposta pelos programas celulares internos que regulam negativamente a proliferação celular e que estão frequentemente associados à ação de genes supressores tumorais, os quais devem assim ser inativados (Hanahan & Weinberg, 2011).

4.3. Capacidade de Evasão à Apoptose

A apoptose é desencadeada por uma variedade de sinais fisiológicos, sendo desenrolada numa série de passos precisamente coreografados, com uma duração entre 30 a 120 minutos. A maquinaria da apoptose compõe-se de sensores proteicos que fiscalizam o ambiente interno da célula e externo a ela, à procura de sinais indicativos de que ela deve viver ou morrer; e de executores, comandados por esses sensores, que se encarregam de causar a morte celular (Hanahan & Weinberg, 2000).

As células cancerígenas ou pré-cancerígenas devem adquirir a capacidade de desativar a sua “morte programada”. A resistência à apoptose pode ser adquirida por estas células através de uma variedade de estratégias i) a inibição do gene supressor tumoral p53; ii) o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas ou iii) a repressão da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Garrett, 2001; Hanahan & Weinberg, 2011).

A mais comum e mais conhecida aquisição de resistência ao processo de morte celular programada, é sem dúvida, a mutação que envolve o gene supressor tumoral p53, que resulta na inativação funcional do seu produto, a proteína p53. Esta alteração é observada em mais de 50% dos cancros em humanos e resulta na remoção de um componente chave do sensor de lesões no ADN, que pode induzir a cascata apoptótica efetora (Harris, 1996).

4.4. Potencial Replicativo Ilimitado

As três capacidades adquiridas e referidas anteriormente (autosuficiência em sinais de crescimento celular, insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento e evasão à apoptose) conduzem a um escape ao programa de crescimento de uma célula, que naturalmente ocorreria de forma dependente dos sinais no seu microambiente. Seria assim de esperar que, esta desregulação no programa de proliferação, fosse suficiente para permitir a geração das populações celulares que constituem os tumores. No entanto, pesquisas realizadas ao longo dos últimos 30 anos indicam que esta perturbação adquirida na sinalização célula-a-célula, por si só, não garante o crescimento expansivo do tumor (Hanahan & Weinberg, 2011). Ainda assim e mesmo tendo adquirido estas capacidades, a célula, num determinado momento, vai parar de se multiplicar. Isto ocorre porque muitas células e até possivelmente todos os tipos de células de mamíferos, possuem um programa intrínseco e autónomo que limita a sua multiplicação e que parece operar de forma independente às vias de sinalização célula-a-célula, acima descritas (Hannah & Weinberg, 2011).

O trabalho inicial de Hayflick (1997) demonstrou que as células em cultura têm um potencial replicativo finito, ou seja, elas param de crescer devido a um processo denominado senescência.

Contudo, ao contrário das células normais, a maioria das células tumorais em cultura parecem ser imortais, o que sugere que o potencial replicativo ilimitado é um fenótipo que foi adquirido *in vivo* durante a progressão do tumor e que foi essencial para o desenvolvimento do seu estado de crescimento maligno (Hayflick, 1997). Este resultado sugere que, em algum momento, durante o curso da progressão tumoral e envolvendo populações de células pré-malignas, se rompe a barreira de mortalidade e estas células adquirem um potencial replicativo ilimitado (Hanahan & Weinberg, 2011).

Como se sabe, à medida que a célula se vai dividindo e consequentemente, à medida que a replicação vai ocorrendo, o último fragmento de Okazaki não é replicado, o que tem como consequência, o encurtamento progressivo do telómero (Hannah & Weinberg, 2000). Quando os telómeros atingem o denominado ponto crítico é impossível prosseguir com a replicação. Ao atingirem o ponto crítico, as células entram em senescência (estado não proliferativo mas viável) ou crise (envolve morte celular) o que determina o final da sua vida replicativa (Hannah & Weinberg, 2000).

As células neoplásicas imortalizadas adquirem a capacidade de ultrapassar, indefinidamente este limite de ciclos sem entrar em senescência ou crise, devido principalmente à reativação da telomerase que lhes permite evitar a erosão telomérica. Assim, em contraste com a maioria das células normais, a manutenção dos telómeros é evidente em praticamente todos os tipos de células malignas, assim como a expressão da telomerase (Hannah & Weinberg, 2011).

Visto que é detetada telomerase ativa em cerca de 85-90% das células cancerígenas, conclui-se que a regulação positiva ou re-expressão da telomerase que adiciona hexanucleótidos repetidos sobre as extremidades teloméricas do ADN, pode ser a chave para o crescimento contínuo das células tumorais (Bryan & Cech, 1999). A ação desta enzima faz com que as células tumorais não apresentem encurtamento dos telómeros em cada divisão celular e consequentemente assumam a imortalidade.

As restantes 10-15% das células cancerígenas conseguem executar de forma alternativa a manutenção dos telómeros através da ativação um mecanismo denominado alongamento alternativo dos telómeros. Neste mecanismo, uma cadeia de ADN de um telómero liga-se a uma cadeia complementar de outro telómero obtendo assim o modelo para a síntese do novo ADN telomérico, abrindo-se as duas cadeias, que servem de molde à outra (Hanahan & Weinberg, 2011).

Quer seja por um ou por outro mecanismo, nas células cancerígenas, os telómeros são mantidos com um comprimento acima de um limiar crítico e isto, por sua vez, permite a multiplicação ilimitada de células descendentes. Ambos os mecanismos parecem estar fortemente reprimidos

na maioria das células normais, a fim de lhes negar o potencial replicativo ilimitado (Hannah & Weinberg, 2011).

4.5. Indução de Angiogénese Sustentada

À medida que um tumor cresce, as células que o compõe vão ficando cada vez mais distantes dos vasos sanguíneos que alimentam o tecido. Por isso, as células cancerígenas, ou pré-cancerígenas, devem providenciar a formação de novos vasos que as nutram. Se tal não acontecer um tumor não consegue crescer (Hannah & Weinberg, 2011).

A capacidade para induzir e manter a angiogénese parece ser adquirida, de forma discreta, durante o desenvolvimento do tumor, ocorrendo devido a uma alteração no equilíbrio entre os indutores e os inibidores da angiogénese (Hanahan & Folkman, 1996).

Verifica-se que muitos tumores apresentam aumento da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) e/ou do fator de crescimento básico dos fibroblastos (*basic fibroblast growth factor* - FGFb), em comparação com os tecidos normais. Noutros, a expressão de inibidores endógenos, tais como trombospondina-1 (TSP-1) ou interferão- β , encontra-se diminuída. Em alguns tumores podem ocorrer os dois fenómenos simultaneamente, e de fato, estarem mesmo relacionados entre si (Singh et al., 1995; Volpert, Dameron & Bouck, 1997).

Os mecanismos subjacentes a estas mudanças no balanço entre os reguladores angiogénicos ainda permanecem incompreendidos, no entanto, pensa-se que a proteína p53 pode ter influência neste processo. Isto porque se demonstrou que o inibidor TSP-1 é regulado de forma positiva pela proteína p53 nalguns tipos de células. Consequentemente, a perda da função da p53, que ocorre na maioria dos tumores, pode levar à diminuição dos níveis de TSP-1, libertando as células endoteliais dos seus efeitos inibitórios (Dameron, Volpert, Tainsky & Bouck, 1994).

Também o gene do VEGF está sob um controlo transcricional complexo. Por exemplo, em certos tipos celulares, a ativação do oncogene RAS ou a perda do gene supressor tumoral von Hippel-Lindau faz com que haja uma regulação positiva na expressão do VEGF (Rak et al., 1995; Maxwell et al., 1999).

Outra dimensão desta regulação ocorre na forma de proteases que são capazes de controlar a biodisponibilidade dos ativadores e dos inibidores angiogénicos. Assim, uma variedade de proteases pode libertar FGFb armazenado na matriz extracelular (Whitelock, Murdoch, Iozzo & Underwood, 1996), ao passo que a plasmina, pode ser clivada na forma de um inibidor da angiogénese, denominado angiostatina (Gately et al., 1997).

4.6. Capacidade de Invasão de Tecidos e de Metastização

A capacidade de invasão e a ocorrência de metástases, são processos extremamente complexos e os seus determinantes genéticos e bioquímicos ainda permanecem incompreendidos. No entanto, 90% das mortes por cancro em humanos devem-se a metastização (Hanahan & Weinberg, 2000).

Os dois processos estão intimamente ligados, o que justifica a associação numa única capacidade adquirida das células cancerígenas (Hannah & Weinberg, 2011).

A capacidade de invadir e criar metástases, deve-se à capacidade das células neoplásicas sobreviverem longe do tumor primário e colonizarem novos locais no organismo. Na transição do carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo, há o rompimento da membrana basal, pela proliferação de células neoplásicas que possuem elevada capacidade proteolítica. Assim, a travessia das células neoplásicas pelas barreiras da membrana basal é resultado da síntese de proteínas ativas e a aquisição de um fenótipo invasivo (Christofori, 2006).

As capacidades de invasão e metastização de células cancerígenas advêm da perda de controlo nos mecanismos de adesão celular devido a defeitos genéticos e epigenéticos nos genes envolvidos neste processo, resultando na perda da capacidade de diferenciação celular e de inibição por contacto e na promoção da disseminação destas células para locais distantes do seu local de origem (Garrett, 2001; Hanahan & Weinberg, 2011).

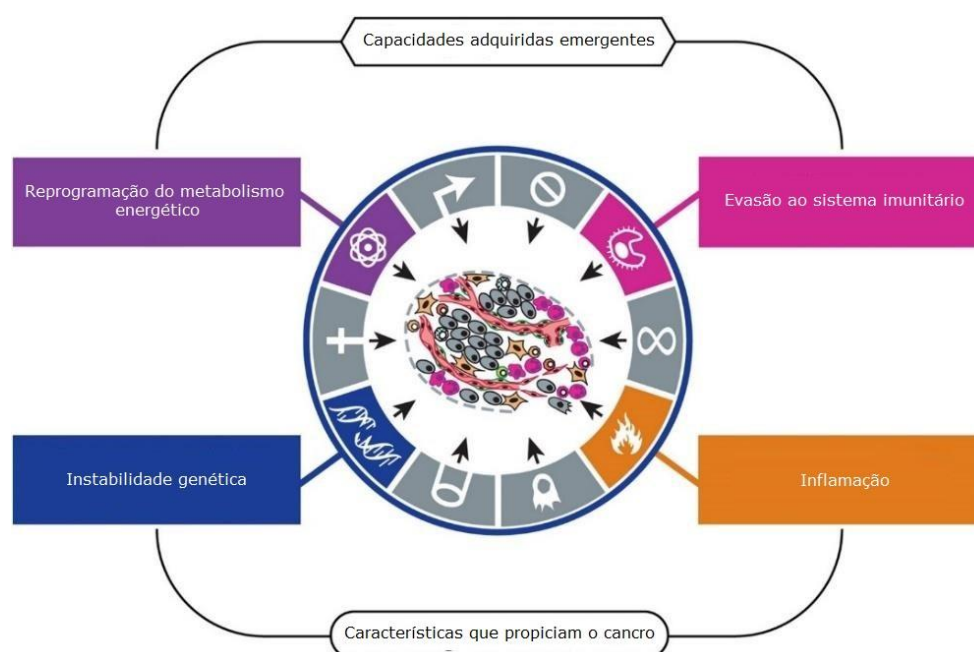
Nas células com capacidade de invadir e metastizar, estão afetadas várias classes de proteínas entre as quais as proteínas responsáveis pela adesão célula-célula, como as caderinas, as proteínas que ligam as células a substratos da matriz extracelular, como as integrinas (Christofori, 2006) e proteínas secretadas, como as metaloproteinases da matriz (*matrix metalloproteinases* - MMPs) (Merdad et al., 2014).

A alteração mais amplamente observada no cancro envolve a E-caderina, uma proteína envolvida na adesão célula-célula, ubiquamente expressa em células epiteliais. A E-caderina age como um supressor da invasão e metástase, e por isso a sua inibição, por repressão da expressão e/ou mutação pontual, está associada ao processo de invasão e metastização nos tumores epiteliais (Hanahan & Weinberg, 2011).

A invasão e a metastização levada a cabo pelas células cancerígenas, faz com que estas experienciem uma mudança de microambiente durante o seu percurso. Por conseguinte, a colonização bem-sucedida destes novos sítios (locais e distantes) exige adaptação, o que é conseguido através de adaptações das sub-unidades α ou β das integrinas, realizadas pelas células cancerígenas migratórias (Hannah & Weinberg, 2011).

No estudo de 2011, Hanahan e Weinberg consideram para além das seis características enumeradas em 2000, a instabilidade genómica e a inflamação, como características que propiciam o cancro (figura 2). Por último, referem também duas características importantes e que provavelmente serão novas características tumorais: a evasão ao sistema imunitário e a reprogramação do metabolismo energético (figura 2) (Hannah & Weinberg, 2011).

Figura 3 – Características adquiridas emergentes, evasão ao sistema imunitário e a reprogramação do metabolismo energético. Características que propiciam o cancro, a instabilidade genómica e a inflamação (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).



As células cancerígenas conseguem escapar à sua destruição ao desativarem os componentes do sistema imunitário que têm como função eliminá-las. Uma das estratégias utilizadas neste sentido é a secreção pelas células cancerígenas, de fatores imunossupressores tais como o fator de crescimento transformador- β (*transforming growth factor beta* - TGF- β), que vão inativar as células NK e os linfócitos T citotóxicos (Shields, Kourtis, Tomei, Roberts, & Swartz, 2010; Yang, Pang & Moses, 2010). Outro mecanismo utilizado na evasão ao sistema imunitário é o recrutamento de células inflamatórias, que são imunossupressoras, nomeadamente as células Tregs e as células supressoras derivadas da linhagem mielóide (*myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs), ambas capazes de suprimir as ações de linfócitos citotóxicos (Hanahan & Weinberg, 2011).

Outra característica fundamental das células cancerígenas está associada à reprogramação do seu metabolismo energético, por forma a adquirirem a energia necessária para conseguirem proliferar descontroladamente (Hanahan & Weinberg, 2011).

As células tumorais parecem favorecer a produção de lactato em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Hanahan & Weinberg, 2011). Uma explicação para isto, assenta no fato de a glicólise permitir o desvio de intermediários da via glicolítica para várias vias biossintéticas, incluindo as que geram nucleósidos e aminoácidos, o que por sua vez facilita a biossíntese das macromoléculas e organelos, necessária para a formação de novas células. Esta dependência de glicólise pode tornar-se ainda mais acentuada em condições de hipóxia, que ocorre em muitos tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).

No entanto, em alguns tumores existem duas subpopulações de células cancerígenas que diferem nas suas vias de geração de energia. Uma subpopulação consiste em células que segregam lactato enquanto as células da segunda subpopulação utilizam o lactato produzido pelas células vizinhas como a sua principal fonte de energia. Desta forma, estas duas populações funcionam em simbiose (Hanahan & Weinberg, 2011).

5. Quimioterapia Metronómica vs Quimioterapia Convencional

A QC ou de DMT é considerada uma terapêutica não específica, por provocar efeitos tóxicos tanto em tecidos neoplásicos como em tecidos saudáveis uma vez que afeta preferencialmente populações celulares em rápida divisão mitótica, como as da medula óssea e do trato gastrointestinal (Mutsaers, 2009).

Ao basear-se no conceito de DMT, torna-se necessário que, nos protocolos de QC, exista um período de intervalo entre administrações de forma a permitir a recuperação dos tecidos normais com elevada taxa de proliferação celular (Mutsaers, 2007; Mutsaers, 2009).

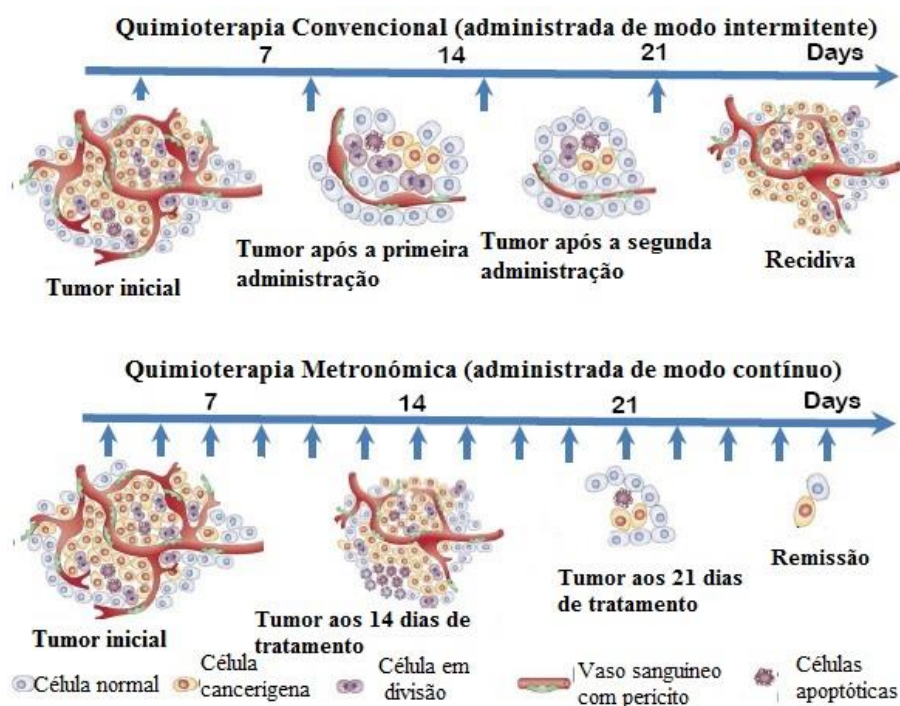
Embora esta abordagem tenha a sua eficácia documentada em inúmeros tipos de tumores, apresenta também limitações importantes que incluem a toxicidade já referida, a ainda presente falta de eficácia em alguns tumores, o desenvolvimento de resistência aos citotóxicos e o elevado custo financeiro (Mutsaers, 2009; Leach et al., 2012).

Por sua vez, a QM baseia-se na administração de compostos citotóxicos, de forma contínua, sem pausa, por um longo período de tempo, recorrendo a doses mais baixas do que as utilizadas convencionalmente (Rodigheri & De Nardi, 2013).

Assim, a terapia metronómica oferece um novo conceito no tratamento do cancro, uma vez que se baseia na evidência de que certos compostos citotóxicos convencionais, quando administrados em baixas doses, podem exercer efeitos anti-angiogénicos e imunomoduladores (Polton, 2014). A sua utilização em pacientes humanos foi inicialmente demonstrada no ano de 2000 a partir dos trabalhos de Folkman (1971) que propuseram a importância de fatores pró-angiogénicos na oncogénese (Polton, 2014).

Desta forma, salientam-se de seguida os principais pontos que diferenciam a QM da quimioterapia citotóxica convencional: i) a frequência de administração, dado que na QM a administração é de forma contínua (figura 4); ii) a dose administrada, uma vez que na QM a dose utilizada é inferior àquela adotada em protocolos convencionais de DMT; iii) a farmacocinética, dado que com a QM consegue-se alcançar um baixo nível de concentração sanguínea do fármaco; iv) as células-alvo, que na QM são as células endoteliais dos vasos sanguíneos do tumor em crescimento; v) a intenção de tratamento, procurando-se sobretudo com a QM o controlo do tumor e não a sua erradicação; vi) a toxicidade para o doente, que com a QM será, à partida, significativamente menor, com a consequente diminuição da necessidade de terapia de suporte.

Figura 4 – A diferença de conceito entre a quimioterapia com DMT e a quimioterapia metronómica (Adaptado de Upreti *et al*, 2013).



5.1. Vantagens e Desvantagens da utilização da Quimioterapia Metronómica

Os pontos de diferenciação entre os dois métodos terapêuticos já referidos traduzem-se na existência de algumas vantagens e desvantagens da QM, de acordo com vários autores (Gasparini, 2001; Kerbel & Karmen, 2004; Lana et al., 2007; Mutasers, 2007).

Começando pelas vantagens, destaca-se: i) atividade contra o parênquima e estroma neoplásico; ii) a maior atividade pró-apoptótica e anti-angiogénica; iii) a possibilidade de combinação com outros citostáticos, com fármacos anti-angiogénicos e inibidores moleculares; iv) possibilidade de administração por longos períodos de tempo; v) menor custo; vi) maior facilidade de administração; vii) menor probabilidade de resistência à quimioterapia, devido à maior estabilidade genética das células endoteliais comparativamente às alterações genéticas que ocorrem nas células tumorais; viii) menores efeitos secundários sistémicos; ix) menor ocorrência de efeitos secundários agudos (Gasparini, 2001; Kerbel & Karmen, 2004; Lana et al., 2007; Mutasers, 2007).

Por sua vez, as desvantagens dizem sobretudo respeito ao fato da determinação das doses metronómicas eficazes e da associação com outros compostos ser feita de forma empírica, surgindo a necessidade de se determinar a dose biológica ótima. Existe assim a necessidade de se definirem protocolos efetivos de QM, de se realizar uma avaliação sistemática dos efeitos secundários associados a esses protocolos e às doses utilizadas (Kerbel, 2007; Elmslie et al., 2008; Burton et al., 2011).

Ainda relativamente à maior facilidade de administração da QM por via oral do citostático, esta traduz-se em alguns benefícios: i) redução da quantidade de material de administração necessário, nomeadamente do material descartável ou de utilização única e consequentes resíduos hospitalares; ii) menor exposição do pessoal veterinário aos citotóxicos; iii) redução das lesões causadas às veias periféricas em doentes que necessitem a longo prazo de um acesso venoso regular; e ainda iv) permitir uma melhor aceitação da medicação anti-neoplásica quer pelo doente quer pelo cliente. A principal desvantagem de medicação oral é a necessidade de disponibilidade de várias formulações para permitir uma dosagem exata com base na área de superfície corporal.

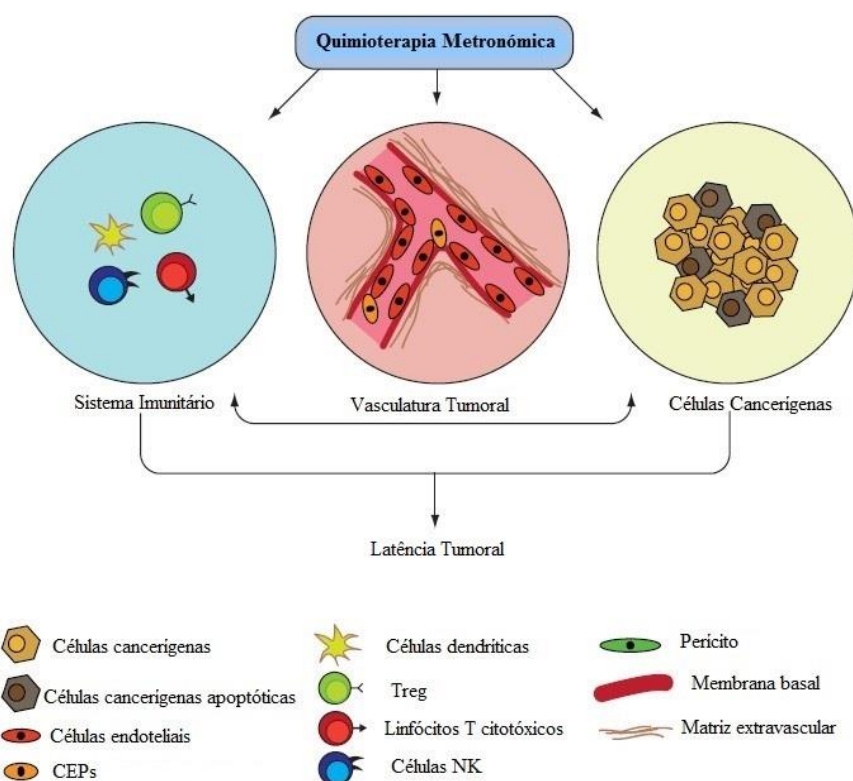
6. Mecanismo de ação dos fármacos utilizados em Quimioterapia Metronómica

De acordo com Pasquier, Kavallaris e André (2010) a quimioterapia metronómica induz importantes efeitos anti-angiogénicos [inibição da proliferação, migração e morfogénese das células endoteliais; diminuição da viabilidade das células progenitoras endoteliais (CEPs) e aumento da expressão de TSP-1], levando a uma redução da vasculatura do tumor.

Como se pode perceber, a capacidade anti-neoplásica da QM é sobretudo através da sua atividade anti-angiogénica, no entanto, está também descrita a ocorrência de uma estimulação positiva do sistema de vigilância imunológica anti-tumoral. Para além disto, outros autores defendem que dependendo do tumor e do citostático administrado, a quimioterapia metronómica pode ter ainda ação citotóxica direta nas células tumorais (Scharovsky et al., 2009).

Pelo exposto, pode concluir-se que a QM para além do efeito anti-angiogénico e modulação do sistema imunitário, pode também apresentar, em alguns casos, uma ação citotóxica direta sobre as células neoplásicas (figura 5).

Figura 5 – Alvos múltiplos da quimioterapia metronómica (Adaptado de Pasquier et al., 2010).



Assim, atualmente sabe-se que os protocolos de QM atuam no microambiente do tumor, através de um conjunto de diferentes mecanismos: modulação angiogénica, imunológica e citotóxica. Ao ter como alvo estes três compartimentos, que por sua vez são capazes de se estimularem uns aos outros, ocorre uma amplificação dos efeitos anti-neoplásicos o que, em teoria, conduz a um estado de latência tumoral. Esta hipótese foi defendida por Pasquier et al. (2010), que referiram que pela inibição da angiogénese tumoral, juntamente com mecanismos envolvidos do sistema imunitário, a quimioterapia metronómica pode ser capaz de induzir e manter o estado de latência tumoral (figura 5). No entanto, tal como refere o mesmo autor, não há ainda uma

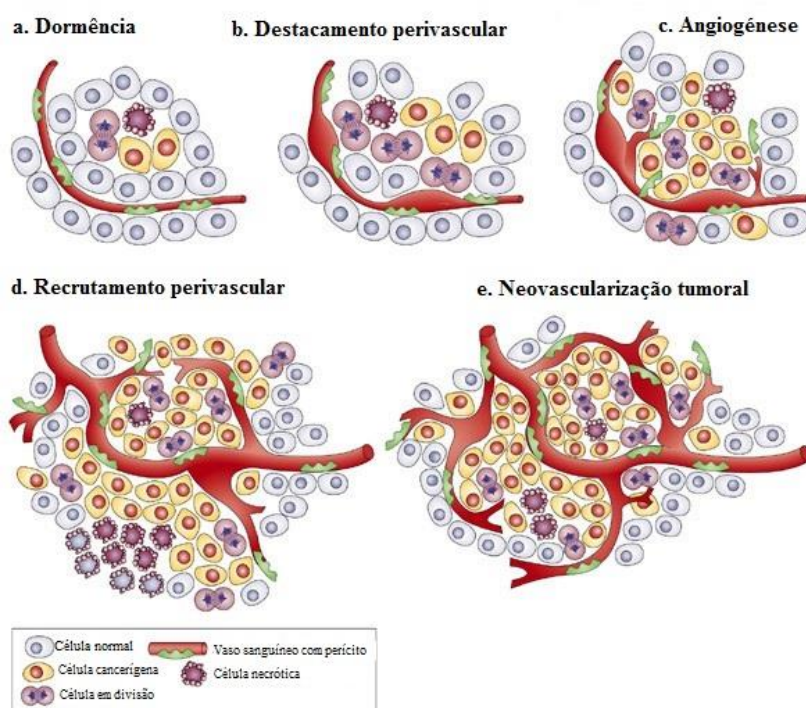
evidência clara de que a quimioterapia metronômica possa induzir diretamente a latência das células tumorais (Pasquier et al., 2010).

6.1. Atividade Anti-Angiogénica

Por definição, a angiogénese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas vasculares pré-existentes e que se dividem rapidamente. Para além da angiogénese, os tumores podem também estimular a vasculogénese, a qual é definida como a formação de um novo vaso sanguíneo a partir de células precursoras derivadas da medula óssea (Biller, 2014).

Independentemente da via e para que o crescimento do tumor não fique limitado a apenas alguns milímetros, este precisa de ultrapassar a falta de disponibilidade em oxigénio e outros nutrientes essenciais (Biller, 2014). Para tal, é necessária a indução de uma nova vasculatura tumoral, capaz de fornecer nutrientes e metabolitos ao tumor e de remover os produtos de excreção segregados pelas células tumorais em rápida proliferação (Biller 2014). Este fenómeno é denominado de “switch” angiogénico (Hanahan & Folkman, 1996) e refere-se ao espaço temporal em que ocorre a transição do estado de dormência, ou estado avascular, para um estado hipervascularizado e de possível rápida progressão de um tumor (Bergers & Benjamin, 2003) (figura 6).

Figura 6 – Etapas do “switch” angiogénico (Adaptado de Bergers & Benjamin, 2003).



Como a angiogênese é tão importante para a sua sobrevivência, os tumores são capazes de interromper o equilíbrio normal entre as moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas (Biller, 2014). Desta forma a angiogênese tumoral, em particular, é um processo altamente complexo e regulado que envolve a participação de várias moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas endógenas (angiostatina, endostatina, esteróides angiostáticos, interferões, interleucina-12, ácido retinóico e inibidor das metaloproteinases 1 e 2) (Folkman, 2002; Mutsaers, 2009).

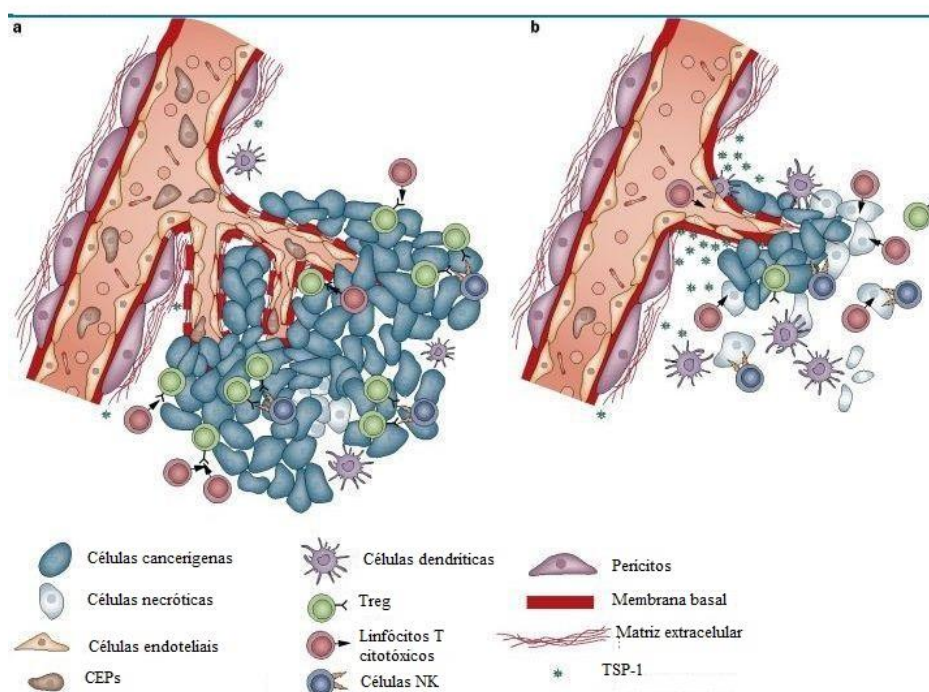
Ao contrário da QC, o alvo principal da QM é a própria vasculatura tumoral (especificamente, as células endoteliais), em vez das células tumorais, sendo esta a razão para Browder e colaboradores (2000), descreverem esta estratégia de tratamento com o termo quimioterapia anti-angiogênica.

Este efeito angiostático foi comprovado através da análise imuno-histoquímica e com ressonância magnética com contraste, de tumores tratados com doses baixas de CIC, que indicaram que o efeito anti-tumoral deste tratamento, é sobretudo, uma consequência da lesão letal causado às células endoteliais em proliferação, resultando na necrose central dos tumores (Browder et al., 2000; Zhao, Jiang, Hahn & Mason, 2005). Vários estudos, a maioria *in vitro*, indicaram que as células endoteliais ativadas dos vasos sanguíneos capilares recém-formados, são elevada e seletivamente sensíveis a doses muito reduzidas de vários quimioterápicos (Grant, Williams, Zahaczewsky & Dicker, 2003). Também Mutsaers (2009) refere que existe uma sensibilidade intrínseca das células endoteliais vasculares a doses baixas dos citotóxicos, justificando assim o fato de existir efeito anti-angiogênico por ação sobre as células endoteliais em multiplicação, mas os efeitos tóxicos na medula óssea ou no aparelho gastrointestinal serem pouco expressivos (Mutsaers, 2009). Elmslie et al. (2008) afirmaram que as células endoteliais e as suas células progenitoras circulantes, são mais sensíveis à exposição contínua de baixas doses de quimioterápicos e menos suscetíveis a sofrerem mutações genéticas, sendo por isso menos provável que desenvolvam resistência ao composto utilizado. Rodigheri e De Nardi (2013), descrevem que o efeito anti-angiogênico desta terapia é resultante do fato de a QM afetar as células endoteliais de uma forma muito mais direta e seletiva em relação a outros tipos de células e tecidos.

Alguns mecanismos de ação anti-angiogênica, através dos quais se pensa que a QM atua, incluem: i) a diminuição do número de CEPs, que são componentes do microambiente tumoral e que desempenham um papel importante no aumento da angiogênese; ii) a diminuição da libertação do VEGF e iii) o aumento da produção de TSP-1 (um potente inibidor da angiogênese).

As CEPs são libertadas na medula óssea e migram para o local do tumor em desenvolvimento. Estas células, apesar de não serem neoplásicas, tornam-se elementos estruturais críticos que permitem o crescimento de células neoplásicas, tanto no local do tumor primário como em metástases à distância. Estas células parecem ter uma sensibilidade específica a esquemas posológicos de QM, enquanto que, com um protocolo de DMT, os intervalos de tempo entre as administrações permitem o seu repovoamento e a aquisição de resistências à quimioterapia, como já foi mencionado (Bertolini et al., 2003).

Figura 7 – Teoria explicativa da ação da quimioterapia metronómica. Pode observar-se um modelo esquemático do tumor e do seu microambiente. a) Antes da quimioterapia metronómica. b) Depois da ação da quimioterapia metronómica (Adaptado de Pasquier et al., 2010).



O VEGF é um dos mais importantes e essenciais fatores envolvidos na angiogénese, com propriedades de permeabilidade vascular específicas para as células endoteliais, existindo em grandes quantidades no tecido tumoral (Marconato, 2009). Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o VEGF pode ser considerado um marcador do processo de angiogénese e que a sua regulação negativa pode estar implicada na ação da QM (Folkman, 2002; Mutsaers, 2007).

Importa referir que, durante o processo de desenvolvimento tumoral, outros fatores para além do VEGF (como o FGFb e o PDGF) também sofrem uma regulação positiva. Porém, destes, o VEGF é o mais importante na angiogénese, tendo a sua estimulação efeitos diretos sobre a proliferação e migração das células endoteliais e na mobilização das CEPs da medula óssea

para os locais de neovascularização (Biller, 2014). Resultante da sua atividade, ocorre uma vasodilatação mediada pelo óxido de nítrico (NO) e um aumento da permeabilidade das células endoteliais, importante para a passagem de proteínas plasmáticas como o fibrinogénio e o plasminogénio, que servirão de molde para a organização das células endoteliais constituintes dos novos vasos. O aumento da permeabilidade vascular é devido ao aumento da secreção e ativação de MMPs que degradam a matriz extracelular próxima do tumor, favorecendo a migração de células endoteliais no sentido deste (Conway, Collen & Carmeliet, 2001).

A TSP-1 é um potente inibidor da angiogénese, que faz parte da matriz extracelular. Trata-se de uma proteína glicosilada que participa nas interações célula-célula e célula-matriz, sendo que a sua atividade é inibida após o “switch” angiogénico. Quando ligada aos seus recetores, inibe a cadeia de transdução de sinal mediada pelo VEGF e FGFb (Distler & Hirth, 2003; Fleitas et al., 2013). Em doentes humanos com cancro, verificou-se que o aumento dos níveis séricos ou intratumorais de VEGF e a diminuição dos níveis de TSP-1, estão associados a um pior prognóstico em várias neoplasias malignas como os carcinomas do pulmão, da mama e da bexiga (Shariat et al., 2010; Fleitas et al., 2013).

Em resposta a doses baixas de CIC a TSP-1 é regulada positivamente com consequente apoptose das células endoteliais e a supressão do crescimento tumoral (Polton, 2014).

Embora preliminares, em medicina veterinária vários estudos sugerem que existe evidência de que a QM com CIC interfere com a angiogénese tumoral. Alguns destes estudos mostram que a combinação da QM com um anti-inflamatório não esteróide (AINE) pode aumentar a sua eficácia anti-angiogénica (Biller, 2014).

É ainda muito importante salientar que vários estudos experimentais, que utilizaram a CIC metronomicamente, têm demonstrado que este tratamento poderá ser muito mais eficaz quando combinado com outros compostos anti-angiogénicos, tais como o péptido derivado da trombospondina (ABT-510) (Yap et al., 2005) ou a talidomida (Zhao et al., 2005).

6.2. Modulação do Sistema Imunitário

O sistema imunitário tem um papel muito importante na implementação, desenvolvimento e controlo do cancro, uma vez que a capacidade dos tumores crescerem escapando à vigilância imunológica, é uma característica do processo neoplásico. Os doentes oncológicos com tumores ativos têm o seu equilíbrio imunológico alterado, de tal forma que o organismo tolera o tumor e não é capaz de montar uma resposta imune adequada (Fin, 2012).

A destruição das células tumorais pode ser mediada por linfócitos, nomeadamente linfócitos T citotóxicos, células T-helper, e/ ou células NK. Assim, a existência de um ambiente que

favoreça a supressão imunitária, em vez da sua ativação, possibilita a evasão das células neoplásicas à vigilância imunológica.

Para que tal aconteça, está comprovado que a tática utilizada pelos tumores consiste no recrutamento de células Tregs e de MDSCs. Estas células têm funções importantes no controlo da inflamação patológica tanto em condições fisiológicas, como oncológicas, assim como um papel determinante na inibição da resposta imune anti-tumoral (Gallimore & Simon, 2008; Mutsaers, 2009), contribuindo, por isso, para o estabelecimento da tolerância neoplásica e malignidade (Marconato, Ruess-Melzer, Buchholz, & Kaser-Hotz, 2011; Umansky & Sevko, 2013).

Um mecanismo complementar, que possivelmente explica os benefícios da QM, é a modulação do sistema imunitário, ao atuar sobre as células imunitárias, também presentes no microambiente do tumor (Mutsaers, 2009). O efeito imunoestimulador que a QM parece apresentar, está associado à diminuição do número das células Tregs e à supressão das suas funções inibitórias, o que conduz à proliferação de células T periféricas responsáveis pela destruição das células tumorais (Scharovsky et al., 2009; Burton et al., 2011). As Tregs incluem linfócitos CD4⁺ e CD25⁺ (Pasquier et al., 2010; Koumariou et al., 2014) que suprimem a atividade das células efectoras específicas [os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ e células T-helper CD4⁺] e das células efectoras não específicas (células NK e células T NK) (Gallimore & Simon, 2008; Mross & Steinbild, 2012). Esta supressão é conseguida através do contacto célula a célula e através da produção de citocinas supressoras, como a interleucina-10 (IL-10), a interleucina-2 (IL-2) e o TGF- β (Josefowicz, Lu & Rudensky, 2012). Além disso, está também confirmado que a QM promove a maturação de células dendríticas (Mutsaers, 2009; Pasquier et al., 2010). Evidências crescentes têm demonstrado que as respostas imunitárias anti-tumorais podem ser cruciais para o controlo do cancro a longo prazo (Pasquier et al., 2010; Loven, Hasnis, Bertolini & Shaked, 2013). Como a compreensão dos efeitos imunomoduladores dos compostos quimioterápicos continua crescer, é expectável que a combinação da QM com a imunoterapia se torne uma área de investigação ativa em oncologia veterinária (Biller, 2014).

Tem sido ainda proposto que a quimioterapia em regime metronómico possa afetar diretamente as células estaminais tumorais (*cancer stem cells* - CSCs), causando a sua desregulação e erradicação (Reya, Morrison, Clarke & Weissman, 2001). As CSCs são uma subpopulação de células cancerígenas que podem atuar como células estaminais normais, podendo assim, iniciar o crescimento tumoral (figura 8) (Scaden, 2006; Loven et al., 2013).

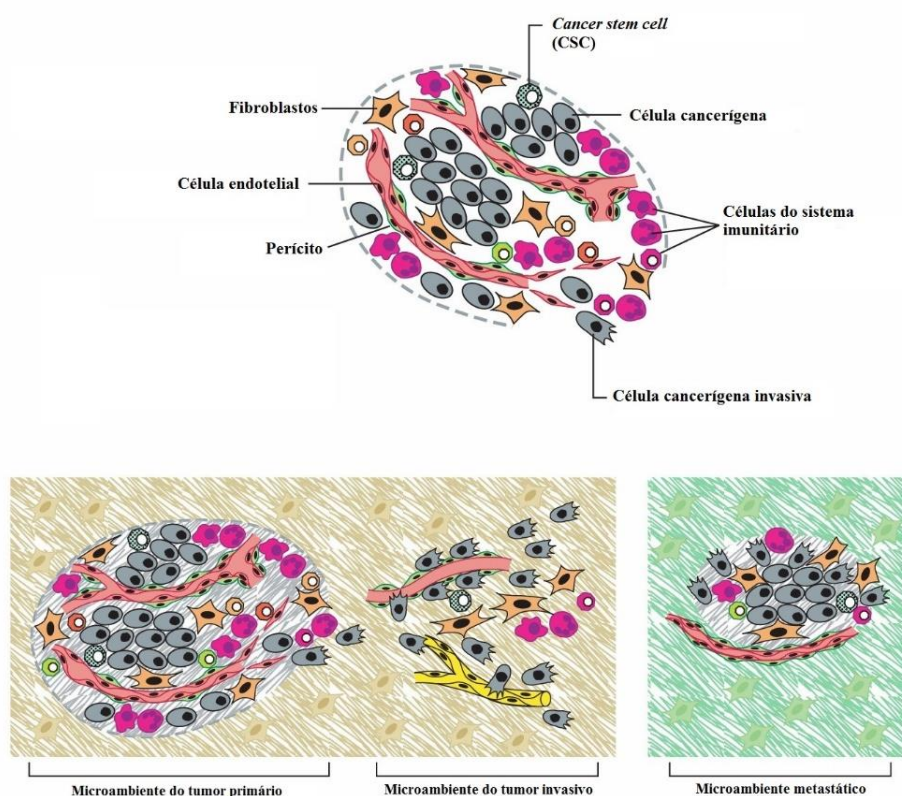
O que distingue as CSCs das restantes células tumorais é a sua capacidade de auto- renovação e de diferenciação, juntamente com os sistemas de reparação do ADN e ainda a capacidade de produzir elevados níveis de VEGF quer em condições normais, quer em condições de hipóxia,

o que lhes confere um forte poder angiogénico (Ribatti, 2012). Além disso, estas células têm ainda sido consideradas como a principal fonte de resistência dos tumores à quimioterapia e radioterapia convencionais (Vives et al., 2013; Malik, Raina & André, 2014).

Segundo dados recentes, a base racional que suporta este terceiro mecanismo de acção da QM (juntamente com efeitos imunomoduladores e anti-angiogénicos) está no fato de as CSCs estarem localizadas na proximidade da vasculatura tumoral (Loven et al., 2013).

No entanto, a evidência acerca da interação entre a QM e as CSCs ainda é limitada não permitindo obter quaisquer conclusões definitivas. Contudo, como a QM tem propriedades anti-angiogénicas, deve ser avaliada como um possível tratamento para atingir as CSCs presentes no microambiente do tumor.

Figura 8 – CSCs como parte do microambiente tumoral (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).



7. Indicações Clínicas para a realização de Quimioterapia Metronómica

Atualmente, a QM é utilizada sobretudo no controlo paliativo de neoplasias recidivantes, refratárias, não extirpáveis ou metastáticas, bem como no tratamento de doentes debilitados ou cujos proprietários rejeitam as terapias convencionais de QC devido aos efeitos adversos que estas podem desencadear (Rodigheri & De Nardi, 2013).

De uma forma geral, a QM tem vindo a ser considerada nas seguintes situações: i) tratamento de primeira linha, usado em doentes com doença avançada e/ou doença incurável, para os quais um protocolo quimioterapêutico tradicional implicaria toxicidade elevada, assegurando-se desta forma uma toxicidade inferior; ii) terapia de consolidação, com a intenção de prolongar o estado clínico de remissão adquirido em doentes com alto risco de recorrência da doença ou como uma terapia adjuvante após a cirurgia e/ou radioterapia, ou ainda após protocolos de quimioterapia de DMT em combinação subsequente com a quimioterapia de baixa dose (*chemo-switch*), com o objetivo de destruir células tumorais residuais ou micrometástases e evitar a neoangiogénese; iii) terapia de manutenção, como substituto de protocolos convencionais anteriores, após se alcançar a resposta esperada com os mesmos, com a intenção de a manter, oferecendo ao doente uma qualidade de vida superior através de uma alternativa menos tóxica (Marconato et al., 2011; Loven et al., 2013).

Uma outra forma de utilização da QM, referida anteriormente, que tem ganho maior relevância nos últimos tempos, é denominada de *chemo-switch* (C-S). Esta modalidade terapêutica compreende todos os protocolos de quimioterapia de DMT em combinação subsequente com a quimioterapia de baixa dose. Surge como uma abordagem que se baseia no fato de que todos os efeitos dos protocolos metronómicos no tumor e no seu microambiente poderão ser mais efetivos quando a neoplasia já se encontra sob controlo ou, pelo menos, menos ativa (Bellmunt et al., 2010; Malik et al., 2014).

Kerbel e Kamen (2004) foram os primeiros a sugerir que os dois modelos terapêuticos poderiam ter um efeito sinérgico. Um ano mais tarde, Shaked et al. (2005) sugeriram que a quimioterapia de DMT enfraqueceria o tumor antes do início do tratamento com baixas doses, que posteriormente produziria os seus efeitos múltiplos (Pietras & Hanahan, 2005; Romiti et al., 2013). Recentemente, Vives et al. (2013) demonstraram também que, em modelos de tumores pancreáticos, a utilização de protocolos de C-S (DMT seguida por QM com gencitabina) apresentavam os resultados mais promissores.

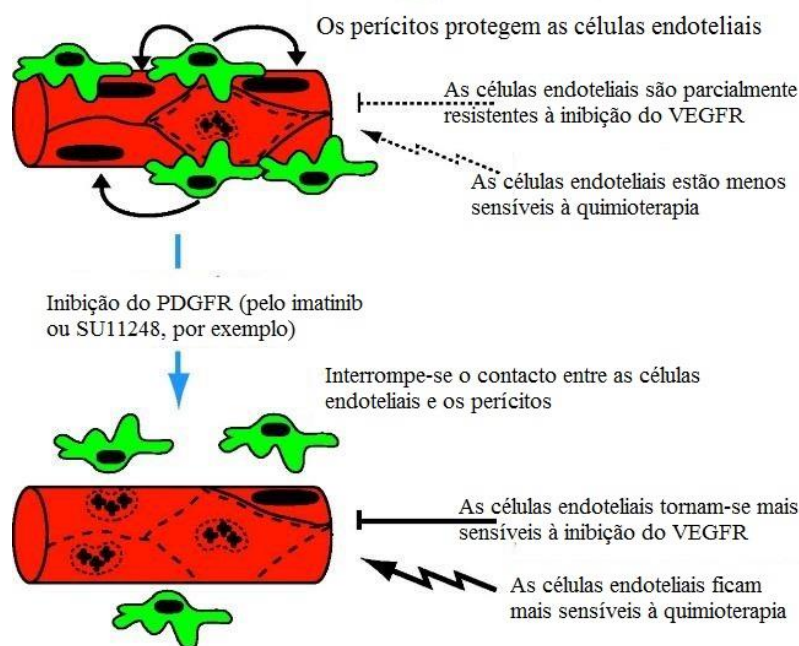
Também no ano de 2005, Pietras e Hannahan, utilizaram um protocolo C-S em roedores, no qual se destacou a sua ação prejudicial sobre os perícitos. Neste trabalho foi utilizado um protocolo C-S, que envolveu a utilização da DMT seguida de QM associada a dois inibidores dos recetores de tirosina-cinase, imatinib e o SU11248, ocorrendo assim a inibição simultânea do recetor do fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor receptor* – VEGFR) e do recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor receptors* - PDGFR), respetivamente.

Embora seja amplamente aceite que as células endoteliais são alvos válidos da terapia anti-cancerígena, os perícitos, foram também reconhecidos como um alvo complementar muito importante da QM (Pietras & Hanahan, 2005).

A explicação para este fato baseia-se na seguinte premissa: os perícitos são células que se encontram em contacto íntimo com as células endoteliais, nos pequenos vasos e capilares sanguíneos, onde servem de reguladores da formação e da função do vaso sanguíneo. Desta forma, qualquer composto usado simultaneamente com a QM, e que tenha como alvo estas células em específico, irá, em teoria, amplificar os efeitos anti-angiogénicos da QM. Uma parte importante da homeostase dos perícitos é regulada pelo sistema ligando/recetor PDGF/PDGFR (Pietras & Hanahan, 2005).

Como se pode verificar na figura 9, a inibição do PDGFR, interrompe o contacto célula a célula, entre as células endoteliais e os perícitos na vasculatura tumoral, removendo-se assim o efeito protetor que os perícitos têm sobre as células endoteliais, fazendo com que estas se tornem mais suscetíveis ao tratamento (Pietras & Hanahan, 2005).

Figura 9 – Mecanismo de ação do protocolo de C-S nos perícitos e células endoteliais (Adaptado de Pietras & Hannahan, 2005).



8. Fármacos utilizados em Qimioterapia Metronómica

Os protocolos de QM são ainda considerados experimentais, uma vez que ainda não está estabelecida uma padronização no tratamento, existindo apenas estudos (na fase I ou II) que utilizam fármacos em regime metronómico e que têm obtido resultados muito encorajadores (Scharovsky et al., 2009).

O fármaco citostático mais utilizado em QM (em medicina humana e veterinária) é a ciclofosfamida ($7-25 \text{ mg/m}^2$, PO, SID) seguida do clorambucilo (4 mg/m^2 ou $0,2 \text{ mg/kg}$, PO, SID) e a lomustina ($2,8 \text{ mg/m}^2$, PO, SID). No Homem, são ainda usados outros compostos como a capecitabina, a gencitabina, a vinorelbina, a temozolomida, os taxanos (docetaxel e o paclitaxel) e o topotecano (Leach et al., 2012; Penel, Adenis & Bocci, 2012; Tripp et al., 2011). Na oncologia veterinária, para além dos compostos citostáticos clássicos também têm sido incluídas outras moléculas nos protocolos de QM, com o objetivo de aumentar o seu potencial anti-angiogénico. Destes fármacos destacam-se, pela sua maior utilização os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e os compostos anti-vasculares direcionados, como os anticorpos monoclonais e os inibidores de recetores de tirosina- cinase (Barros & Repetti, 2015).

8.1. Ciclofosfamida

A CIC é um composto alquilante normalmente utilizado em protocolos multi-fármaco, na terapêutica de linfomas, carcinomas e sarcomas. Devido ao seu mecanismo de ação, tem um largo espectro anti-neoplásico, e na verdade tem demonstrado sucesso como adjuvante terapêutico em várias neoplasias malignas (Chun, Garret & Vail, 2007).

A utilização mais frequente da CIC em medicina veterinária é como parte integrante de um protocolo multi-fármaco, o CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona) (Chun et al., 2007; Best & Fry, 2013), sendo o protocolo de primeira linha para o tratamento de linfoma de alto grau. Quando utilizada neste protocolo, a CIC é administrada, tal como os outros fármacos, de forma periódica em doses elevadas, praticando-se o princípio de DMT (Vail, 2010).

Este fármaco consiste numa pró-fármaco que requer oxidação hepática, pelo sistema citocromo P450, para que se forme o seu metabolito farmacologicamente ativo (4-hidroxíciclofosfamida). Este metabolito é capaz de entrar no espaço intracelular onde posteriormente é formada a mostarda de fosforamida e a acroleína (Best & Fry, 2013). A mostarda de fosforamida atua intracelularmente como um composto alquilante que causa lesão no ADN e citotoxicidade. A ação citotóxica da CIC é assim atribuída à mostarda de fosforamida, tendo a acroleína pouca ou até nenhuma atividade anti-tumoral.

Uma vez ativada, a CIC exibe o seu principal efeito – a inibição da síntese de ADN, mas também da síntese de ácido ribonucleico (ARN) e proteínas. Tais efeitos acontecem porque os compostos alquilantes formam ligações covalentes com compostos orgânicos, em particular com os ácidos nucleicos, de tal modo que um átomo de hidrogénio é substituído por um grupo alquilo. O local mais comum onde ocorre alquilação do ADN é na posição N-7 do nucleótido guanina. Esta alquilação interfere com a replicação do ADN bem como com a transcrição e replicação do ARN, perturbando assim a função dos ácidos nucleicos e inibindo a mitose (Huitema et al., 2000; Best & Fry, 2013).

A CIC é excretada inalterada ou sob a forma de metabolitos, por via renal, e tem um tempo de semi-vida de 4-12 horas. A utilização em doentes com neutropénia, trombocitopénia, que realizaram radioterapia prévia, imunodeprimidos, com insuficiência hepática e/ou renal deve ser cuidadosa. A CIC apresenta ainda um potencial teratogénico, embriotóxico e causa infertilidade em machos (Dobson, Hohenhaus & Peaston, 2008; Plumb, 2008). Os efeitos secundários mais comuns são a toxicidade hematológica, gastrointestinal e o desenvolvimento de cistite hemorrágica estéril (CHE) (Crow, Theilen, Madewell, Weller & Henness, 1977).

8.2. Clorambucilo

O clorambucilo é considerado um composto alquilante, tal como a ciclofosfamida, e quando utilizado nas doses clássicas, em monoterapia ou em associação, tem eficácia comprovada no tratamento da leucemia linfocítica crónica, linfoma e mieloma (Chun et al., 2007). A dose administrada depende do protocolo utilizado, do tipo de tumor e do estado clínico do doente, contudo tem sido normalmente usado em doses que variam entre 2 e 8 mg/m², SID ou EOD, sendo a dose metronómica mais utilizada para o clorambucilo de 4mg/m², PO, SID (Lana & Dobson, 2010).

A administração de clorambucilo em regime metronómico tem-se mostrado eficaz no tratamento de vários tipos de cancro em cães (Lana & Dobson, 2010). Este composto apresenta várias vantagens para este tipo de protocolos, que vão desde o pequeno tamanho do comprimido, os poucos efeitos adversos relatados - uma toxicidade mínima ao nível da medula óssea e sistema gastrointestinal - propriedades que o justificam como uma escolha atrativa para a utilização em protocolos de QM (Chun et al., 2007). Para além disto o clorambucilo poderá ser uma alternativa à CIC, em doses metronómicas, para o tratamento de carcinoma das células de transição, devido à toxicidade do metabolito da CIC na mucosa vesical (Schrempp et al., 2013).

É encorajador que existam evidências de que o clorambucilo, em doses consideravelmente mais baixas do que a DMT, pode ter efeitos que levam à inibição do crescimento do tumor (Bertolini et al., 2003; Schmidt et al., 2009) bem como o fato de este, tal como a CIC, ter atividade supressora sobre precursores endoteliais vasculares e a vasculogênese, mesmo em baixas concentrações (Bertolini et al., 2003).

Leach et al. (2012), no estudo com o clorambucilo em doses metronômicas ($4\text{mg}/\text{m}^2$, PO, SID), constataram que este foi bem tolerado pelos cães e que teve efeitos terapêuticos contra uma variedade de tumores que ocorrem naturalmente nestes animais. A resposta tumoral incluiu remissão completa em 8% dos casos (3 em 36), remissão parcial em 3% (1 em 36) e doença estável em 47% (17 em 36). Para além das respostas positivas constatadas em alguns dos animais e da estabilização da doença noutros, os investigadores notaram que mesmo nos casos em que a doença progrediu, esta progressão ocorreu de forma mais lenta do que aquela que ocorria antes da administração do clorambucilo. Outro achado encorajador foi o fato de se ter alcançado o controlo do tumor em cães nos quais tinham já falhado outras terapias, incluindo a QC utilizando a DMT. Com base nestes resultados a administração diária de clorambucilo numa dose de $4\text{ mg}/\text{m}^2$ parece ser uma opção de tratamento seguro e eficaz para cães com vários tipos de cancro.

Num estudo realizado por Schrempp et al. (2013), no qual se estudou o tratamento do carcinoma das células de transição recorrendo ao clorambucilo em doses metronômicas ($4\text{mg}/\text{m}^2$, PO, SID), o achado mais importante foi que na maioria (21 em 30 [70%]) dos cães que foram submetidos à administração metronômica deste composto a doença estabilizou ou ocorreu remissão parcial do tumor. Outro achado importante do mesmo estudo foi que a QM com clorambucilo foi bem tolerada pelos cães – apenas 23% destes (7 em 30) desenvolveu sinais de toxicidade ligeiros. Apenas um cão neste estudo teve toxicidade de grau 3.

8.3. Lomustina

A lomustina pertence à classe de fármacos classificados como nitrosureias. Estes compostos são alquilantes bi-funcionais, que podem levar à formação de uma ligação entre duas moléculas de ADN ou entre uma molécula de ADN e uma proteína (Plumb, 2008; Coppoc, 2009).

As nitrosureias são moléculas lipossolúveis que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, sendo por isso utilizadas no tratamento de tumores do sistema nervoso central (Coppoc, 2009). A lomustina tem também mostrado eficácia no tratamento de tumores de células redondas, como no mastocoma, linfoma e sarcoma histiocítico (Fan et al., 2002). Este fármaco encontra-se disponível sob a forma de cápsulas para administração oral sendo rápida e

completamente absorvida após a administração (Lana, 2003). A sua metabolização ocorre no fígado pelo sistema enzimático microsomal oxidativo e é excretada na urina (Chun et al., 2007), e por isso é necessário ter um cuidado especial com os animais com alterações hepáticas (Coppoc, 2009), uma vez que podem também desenvolver toxicidade hepática potencialmente fatal (Chun et al., 2007).

Quando utilizado na DMT este fármaco produz toxicidade na medula óssea, fígado, rins e aparelho gastrointestinal. O fator limitante do tratamento com lomustina é a neutropénia aguda, acompanhada de trombocitopénia, que em cães atingem o seu máximo 7 a 10 dias após a administração (Coppoc, 2009).

A avaliação da utilização da lomustina num protocolo metronómico em animais de companhia é muito escassa (Tripp et al., 2011). Num estudo prospetivo realizado por Tripp et al. (2011) avaliou-se a tolerância à lomustina administrada metronomicamente em cães com neoplasias malignas, tendo-se observado que a dose diária de 2,84 mg/m² foi bem tolerada pelos animais do estudo.

As alterações provocadas pela lomustina, no ADN, afetam preferencialmente os precursores hematopoiéticos numa fase precoce, ocorrendo supressão da medula óssea devido ao efeito cumulativo da dose utilizada. De acordo com Tripp et al. (2011), o tempo médio para o aparecimento de trombocitopénia, em cães a receberem lomustina metronomicamente, é de 12 meses após o início da terapêutica. No mesmo estudo a toxicidade gastrointestinal foi a razão mais comum para a interrupção da terapia, tendo ocorrido em 25% dos animais tratados. No entanto, a toxicidade gastrointestinal observada foi considerada leve, uma vez que todos os episódios de distúrbios gastrointestinais que ocorreram, foram classificados como efeitos adversos de baixo grau. Em todos os casos, a suspensão da administração do fármaco coincidiu com a resolução dos sinais clínicos (Tripp et al., 2011). Neste estudo 15% dos animais da amostra desenvolveram ou apresentaram azotémia progressiva. Deste grupo, apenas um animal estava a receber terapêutica concomitante com AINEs. No entanto, os autores consideram que a doença renal poderá ter sido paraneoplásica, em qualquer um destes cães, uma vez que o padrão não corresponde ao da toxicidade renal, documentada em humanos (Tripp et al., 2011). Não é assim claro se a lomustina em doses metronómicas contribuiu para a doença renal em cães. No entanto os autores recomendam uma avaliação e monitorização da função renal (Tripp et al., 2011).

É de referir que nenhum animal no trabalho desenvolvido por Tripp et al. (2011) demonstrou sinais clínicos ou bioquímicos de insuficiência hepática. Todavia, 21% dos cães neste estudo apresentaram aumentos da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) cerca de 1,5 vezes acima do limite superior considerado fisiológico. Os autores continuam assim a recomendar a

avaliação periódica de parâmetros bioquímicos hepáticos que ajudem a prever e identificar a ocorrência deste tipo de toxicidade, ao utilizar lomustina em doses metronômicas (Trip et al., 2011).

Segundo Kristal et al. (2004), a hepatotoxicidade da lomustina em cães é aparentemente cumulativa, relacionada com a dose, podendo mesmo ser irreversível e fatal. Outros estudos demonstraram que os animais que recebem doses mais elevadas do citostático têm maior probabilidade de apresentar um aumento súbito da ALT, e que por seu lado, a exposição a uma dose inferior pode conduzir a um atraso no aparecimento de lesões hepáticas até um mês, após o início do tratamento (Hosoya et al., 2009; Musser, Quinn & Chretien, 2012).

8.4. Anti-inflamatórios Não Esteróides

Pensa-se que os mediadores inflamatórios desempenham um papel crítico na iniciação e manutenção da sobrevivência e crescimento de células cancerígenas (Masferrer et al., 2000). Um destes mediadores, a prostaglandina E2 (PGE2), é produzido em grandes quantidades pelas células tumorais a partir de ácido araquidónico, por meio de duas enzimas, as ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). Ambas as proteínas são semelhantes na sua estrutura, apesar de terem funções biológicas distintas (Queiroga, 2005). Enquanto a COX-1 tem sido descrita em tumores malignos de cães e em alguns tecidos normais, regulando as funções fisiológicas, a expressão de COX-2 está normalmente ausente das células normais (Queiroga, 2005).

O potencial carcinogénico atribuído à COX-2 e/ou à PGE2 deve-se à sua capacidade de induzir a proliferação celular, evasão à apoptose, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, promoção da angiogénese, invasão tecidular, metástases e evasão à resposta imune anti-tumoral (Lorimier & Fan, 2010).

A COX-2 pode ser sobreexpressa pelas células tumorais ou do estroma, promovendo o crescimento do tumor pela estimulação da angiogénese, uma vez que está associada ao aumento da produção de fatores angiogénicos como o VEGF, o FGFb e/ou o TGF- β (Elmslie et al., 2008). Os níveis elevados de PGE2 provocam supressão da vigilância imunitária dificultando assim a morte das células malignas. Além disso, estudos recentes sugerem que a COX-2 desempenha um papel importante tanto na produção de Tregs como na regulação das suas funções efectoras (Lana et al., 2007; Elmslie et al., 2008).

Em medicina humana, os AINEs têm importância na prevenção e tratamento de alguns tumores tais como o carcinoma do cólon, o cancro da mama e o melanoma maligno (Pires, Garcia, Prada & Queiroga, 2010), sendo as COX-1 e 2 os alvos deste tipo de fármacos.

Em medicina veterinária, nos últimos anos têm surgido uma quantidade considerável de publicações relacionadas com a expressão de COX-2 e/ou da PGE2 numa variedade de tumores epiteliais e não epiteliais (Trumpatori & Lascelles, 2011). Nos cães verifica-se uma sobreexpressão de COX-2 em diversas neoplasias, incluindo carcinomas vesicais, mamários, intestinais, prostáticos, renais, de células escamosas, nasais e orais, melanomas, meningiomas, mastocitomas e osteossarcomas (Prada, Queiroga, Gregório & Pires, 2012).

Muitos estudos preliminares têm demonstrado o efeito anti-angiogénico dos AINEs laboratorialmente e/ou em ambiente clínico (Mutsaers, 2009). Um destes estudos foi desenvolvido em 2000, por Masferrer e colaboradores, os quais avaliaram a influência da COX-2 na angiogénese tumoral e de que modo a sua inibição podia controlar o crescimento tumoral. O que se verificou foi que a inibição observada ocorreu de forma dependente da dose, obtendo-se melhor resposta com doses mais elevadas (Masferrer et al., 2000).

No mesmo estudo, comparou-se ainda a atividade anti-angiogénica (pela medição dos neovasos sanguíneos na córnea de rato) de um inibidor seletivo de COX-2, de um inibidor seletivo de COX-1 e de um inibidor não seletivo. Os resultados obtidos demonstraram que: 1) o inibidor seletivo de COX-1 (SC-560) não apresentou qualquer efeito anti-angiogénico, independentemente da dose usada; 2) o inibidor não seletivo (indometacina) mostrou atividade anti-angiogénica dependente da dose, verificando-se, no entanto, que a obtenção da atividade anti-angiogénica máxima implicou maior toxicidade (efeitos gastrointestinais com peritonite); 3) quanto ao inibidor seletivo da COX-2 estudado (celecoxib), mostrou elevada atividade anti-angiogénica em doses terapêuticas, sem a presença de efeitos secundários.

Como se sabe, os AINEs bloqueiam as enzimas COX - 1 e 2, com maior ou menor especificidade, resultando na redução da síntese de prostaglandinas, que têm um papel importante na inflamação (Lorimier & Fan, 2010; Trumpatori & Lascelles, 2011). Existem dois tipos de AINEs: i) os clássicos, que não apresentam seletividade para nenhuma das isoformas de COX (como por exemplo o carprofeno, o meloxicam e o piroxicam); ii) e os seletivos para COX-2 (como o robenacoxib, o firocoxib e o cimicoxib).

Os fármacos que causam inibição da isoenzima COX-1, afetam a síntese de prostaglandinas constituintes, que contribuem para a proteção gástrica e renal. Por essa razão, o uso destes compostos pode, em alguns casos, estar associado a efeitos secundários nestes órgãos (Lloret, 2008). Contudo, já estão disponíveis em medicina veterinária, AINEs seletivos para COX-2, que como não causam inibição da COX-1 quando utilizados nas doses terapêuticas, apresentam uma redução dos efeitos adversos gástricos e renais, normalmente associados aos AINEs. Dentro das doses recomendadas foi verificada, a longo prazo, boa tolerância a estes compostos.

Contudo, na terapêutica de neoplasias são necessários mais estudos relacionados com a utilização destes fármacos (Lloret, 2008).

Desta forma, os efeitos secundários mais comuns que podem ocorrer devido à utilização de AINEs, são a toxicidade gastrointestinal, renal ou hepática, efeitos que devem ser controlados com exames complementares de diagnóstico durante a sua utilização (Lorimier & Fan, 2010) e medicação preventiva associada.

8.5. Inibidores dos Recetores de Tirosina-Cinase

Os recetores de tirosina-cinase (RTCs) são um grupo importante de recetores da superfície celular que integram funções celulares na proliferação, diferenciação e sobrevivência quando estimulados pelo seu ligando (Blackwood et al., 2012). A sobreexpressão, mutação ou fosforilação autócrina destes recetores tem sido relacionada quer ao crescimento e metastização tumoral quer à neoangiogénese (Blackwood, 2010).

O Kit, o Met e o Axl são exemplos de recetores de tirosina-cinase, todos eles alterados em vários tipos de neoplasias (London, 2009; North & Banks, 2009). Existem ainda recetores de tirosina-cinase importantes na angiogénese, entre os quais o VEGFR, o PDGFR e recetor do fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor receptor* - FGFR) (Eskens, 2004). As isoformas de VEGFR são expressas pelo endotélio vascular e as interações de VEGF-VEGFR são importantes para a migração e proliferação endotelial (London, 2009).

A forma mais eficaz de inibir uma proteína cinase é através da utilização de uma classe de fármacos designada por moléculas inibidoras dos recetores de tirosina-cinase (*tyrosine kinase inhibitors* - TKIs). Os TKIs são caracterizadas por serem inibidores competitivos que bloqueiam, de uma forma reversível ou irreversível, o local de ligação da molécula de adenosina trifosfato (ATP) na cinase. Assim, na ausência de ATP está prevenida a fosforilação do substrato o que resulta na inibição da transdução de sinais posteriores (Marconato et al., 2008; London et al., 2009).

Vários fármacos inibidores de tirosina-cinase estão disponíveis para o tratamento de tumores em medicina humana, e muitos deles têm demonstrado atividade clínica significativa. Em medicina veterinária a sua aplicação é relativamente recente devido ao fato dos alvos de intervenção terapêutica não estarem completamente definidos para a maioria das neoplasias de canídeos e felinos, mas também devido ao seu elevado custo (London, 2009).

O estudo de Liao et al. (2002) foi o primeiro a demonstrar a capacidade destas moléculas para inibir a ativação do c-kit e a proliferação de mastócitos neoplásicos em cães.

A tabela 1 descreve os três TKIs mais utilizados em medicina veterinária. Dois dos inibidores de tirosina-cinase, o masitinib e o fosfato de toceranib, encontram-se autorizados para utilização em medicina veterinária para o tratamento de mastocitomas caninos (London, 2009).

Tabela 2 – Inibidores dos recetores de tirosina-cinase utilizados em medicina veterinária (Adaptado de London, 2009).

Inibidores dos recetores de tirosina-cinase	Alvo molecular	Neoplasias	Espécies-alvo
Fosfato de toceranib	Kit, VEGFR, PDGFR, Flt-3	Mastocitomas, sarcomas, carcinomas, melanomas	Cão
Masitinib	Kit, PDGFR	Mastocitomas	Cão
Imatinib	Kit, PDGFR, Ab1	Mastocitomas, sarcomas	Cão, Gato

9. Utilização segura de fármacos citotóxicos

Uma vez que na QM se utilizam formas farmacêuticas para administração oral, que poderá ser executada pelos proprietários, estes deverão assim ser informados de que o fármaco que está a ser manipulado é citotóxico e do risco que lhe está associado.

Desta forma, o proprietário deverá ser aconselhado a utilizar equipamento de proteção individual, nomeadamente luvas para a manipulação do medicamento.

Em caso de derrame, produção de poeira ou contacto cutâneo, os proprietários deverão lavar a área afetada com água corrente abundante durante pelo menos 20 minutos, ou afastar-se da área de aerossóis, arejá-la bem e evitar que outras pessoas/animais contactem com os mesmos.

Relativamente ao manuseamento dos produtos de excreção, nos gatos, deve proceder-se à limpeza diária da liteira usando para o efeito luvas e máscara, recolhendo os excreta num recipiente apropriado. Preferencialmente deverão utilizar-se materiais com menor potencial para formar aerossóis, tais como a areia aglomerante. Já no caso dos cães, devem recolher-se as fezes, usando para o efeito luvas e sacos de plástico. A urina deverá ser diluída derramando-se água, com adição de composto amoniacal, no local da micção.

Os sacos e as luvas utilizadas devem ser entregues no veterinário para serem tratados como resíduos hospitalares citotóxicos.

10. Efeitos Secundários da Quimioterapia Metronómica com Ciclofosfamida

Os efeitos benéficos que advêm da utilização dos compostos citotóxicos devem ser sempre ponderados face aos potenciais efeitos adversos que esses mesmos compostos podem causar, ou seja, deve sempre considerar-se o quociente risco/benefício. Tal como a maioria dos

citotóxicos, a CIC pode provocar mielosupressão e distúrbios gastrointestinais, toxicidade hepática e renal (Chun et al., 2007; Moore, 2010), tendo sido demonstrado que pode levar à ocorrência de CHE em cães (Garrett, Thamm, Chun, Dudley & Vail, 2002; Best & Fry, 2013), gatos (Peterson, Couto, Hammer & Ayil, 1992; Best & Fry, 2013) e humanos (Levine & Richie, 1989).

Apesar dos estudos de avaliação da toxicidade com protocolos de QM serem escassos, muitos autores afirmam que a toxicidade da QM é muito menor do que a induzida pela QC (Kerbel & Karmen, 2004; Mutsaers, 2009; Scharovsky et al., 2009; Pasquier et al., 2010).

Emslie et al. (2008) trataram trinta cães, com sarcoma de tecidos moles, recorrendo à cirurgia e terapêutica adjuvante com CIC em doses baixas (10mg/m²/dia) associada a piroxicam (0,3 mg/kg/dia). Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos em cinquenta e cinco cães tratados apenas com recurso a cirurgia. Estes autores concluíram que a toxicidade da CIC usada metronomicamente foi limitada, pois 40% dos cães apresentaram efeitos adversos ligeiros (grau 1 e 2) e apenas um apresentou toxicidade de grau 4, com CHE. Os autores concluíram também que a QM parece prolongar o tempo livre de doença, que no grupo de controlo foi de 211 dias, enquanto no grupo tratado com QM adjuvante foi de 410 dias (Emslie et al., 2008).

De uma forma geral os resultados dos estudos existentes quer em humanos, quer em cães, mostram que a QM com CIC é bem tolerada, ocorrendo apenas efeitos adversos ligeiros a moderados (Kerbel & Karmen, 2004; Mutsaers, 2009; Scharovsky et al., 2009; Pasquier et al., 2010). Apesar destas observações, é importante lembrar que a QM apresenta riscos e que alguns fármacos ou associações de fármacos podem originar efeitos adversos imprevistos. Por exemplo, a combinação da QM com substâncias anti-angiogénicas, tais como os inibidores dos recetores de tirosina-cinase, pode aumentar o risco de hipertensão, edema, proteinúria e diarreia em pacientes humanos (London et al., 2003; London et al., 2009; Chon, McCartan, Kubicek & Vail, 2012; London et al., 2012).

A experiência com a terapia combinada em oncologia veterinária é limitada, sendo por isso uma nova área de investigação. Num estudo recente em cães submetidos a terapêutica com toceranib, a adição de CIC em doses metronómicas, não pareceu aumentar a toxicidade (Mitchell et al., 2012).

Gaeta, Brown, Cohen e Sorenmo (2012) concluíram que o risco para o desenvolvimento de CHE pode ser maior com a administração cumulativa de CIC, parecendo assim que é igualmente provável a ocorrência de CHE quer com a QM quer com a DMT (Biller, 2014). A maioria dos estudos descreve a ocorrência de CHE com DMT de CIC em 9%-22% dos animais (Best & Fry, 2013; Rassnick et al., 2014) e com CIC em regime metronómico em cerca de 10%-28,5% dos casos (Emslie et al., 2008; Best & Fry, 2013).

Assim, como acontece em qualquer plano de tratamento quimioterápico, também na QM com CIC se deve fazer um acompanhamento adequado da potencial toxicidade como uma parte da rotina de assistência ao doente.

10.1. Toxicidade Hematopoiética

A mielotoxicidade é considerada uma das complicações mais frequentes da quimioterapia e pode ser responsável, em casos extremos, por citopénias graves que podem pôr em risco a vida do animal.

Os precursores hematopoiéticos são células extremamente quimiosensíveis, que após diferenciação são responsáveis por um *pool* de células hematopoiéticas maduras que normalmente não são afetadas pelos quimioterápicos, e que se mantêm no organismo durante 5-10 dias. Assim, o *nadir* (nível mais baixo de células após o tratamento) ocorre após a morte daquelas células que constituem o *pool*. Posto isto, e dado que os tempos de circulação e de semi-vida de cada linha celular formada na medula óssea são diferentes, a neutropénia ocorre primeiro (menor tempo de semi-vida), seguida de trombocitopénia e, mais raramente, de anemia (Argyle, Brearley, Turek & Roberts, 2008; Frimberger, 2010).

Refira-se ainda que a anemia poderá ser originada por outros fatores que não a mielosupressão pela quimioterapia, tais como a má nutrição e outros fatores relacionados com a própria neoplasia (infiltração da medula óssea) (Couto, 2008; Vail, 2010).

Relativamente à neutropénia, embora seja comum, é geralmente moderada, não acarretando complicações clínicas. Contudo, uma neutropénia mais grave (<1000 neutrófilos/ μL), pode resultar em sépsis.

Para além disto a CIC pode ser ainda responsável pela indução de stresse oxidativo na medula óssea, resultando na inibição das enzimas anti-oxidativas (Manda & Bhatia, 2003). Um crescente número de evidências sugere que a quimioterapia prejudica as funções hematopoiética e imune não só ao causar lesão direta ao ADN, mas também através do aumento da produção de radicais livres de oxigénio (RLOS). Estes são também uma das razões pela qual pode ocorrer mielossupressão, dado que o aumento na sua produção nas células hematopoiéticas e nas células progenitoras pode conduzir à supressão da medula óssea através da indução de apoptose e senescência dessas mesmas células. Além disso, o aumento da produção de RLOS é um dos principais mecanismos pelos quais as MDSCs inibem várias funções imunes.

Portanto, a terapia antioxidante tem sido proposta como tendo potencial para reduzir a supressão hematopoiética provocada pela quimioterapia. No entanto, o seu uso tem sido limitado devido

à preocupação de que a resposta das células tumorais à quimioterapia e à radioterapia possa ser comprometida pelos próprios antioxidantes (Diaz-Montero et al., 2012).

A destruição das células normais pela ação dos citotóxicos pode levar ao esgotamento das células estaminais hematopoiéticas e das células circulantes do sangue periférico, deteriorando o sistema imunitário, suprimindo significativamente a função da medula óssea e levando ao aparecimento de imunodeficiência (Gu et al., 2013). Esta supressão da imunidade e da função hematopoiética pelos compostos anti-neoplásicos conduz a um aumento da probabilidade de falha do tratamento, isto porque tem sido apontado, que o sucesso da terapêutica em doentes com neoplasias malignas depende da eficácia da função hematopoiética e da imunidade anti-tumoral do doente (Danova, Barni, Mastro, Danesi & Pappagallo, 2011).

As estratégias para se conseguir reduzir de forma efetiva os efeitos adversos da terapêutica anti-neoplásica e acelerar a recuperação da função hematopoiética, após a quimioterapia, continuam a ser um problema clínico.

10.2. Toxicidade Gastrointestinal

A toxicidade gastrointestinal é um dos efeitos secundários com ocorrência mais frequente nos tratamentos quimioterápicos. No entanto, como a fração de células mortas é diretamente proporcional à dose de composto citotóxico utilizado (Couto, 2008; Vail, 2010), espera-se que com a QM, a toxicidade gastrointestinal seja muito menor, uma vez que se utilizam doses mais baixas de citotóxico. Porém, é necessário ter em conta o possível efeito cumulativo, devido à utilização a longo prazo, e ainda a utilização de forma combinada com outros compostos, que de alguma forma podem afetar o sistema GI.

Os quimioterápicos são ainda responsáveis por indução de náusea e vômito através de um mecanismo complexo em que há estimulação da zona do quimiorreceptores de disparo ou *chemoreceptor trigger zone*, ocorrendo também a ativação de receptores periféricos pelas substâncias libertadas durante a quimioterapia, cuja informação ascende diretamente ao centro emético, pelo nervo vago e outras vias autonómicas aferentes (Lana & Dobson, 2010).

Em medicina veterinária, a maioria dos quimioterápicos causa emese retardada (24-48h após administração) (Lana & Dobson, 2010) podendo ainda ocorrer outros sinais como a anorexia e diarreia, que podem ser resultado da destruição direta das células do epitélio intestinal. De acordo com Richardson e Dobish (2007) e Vail (2009) o mecanismo que provoca diarreia resulta de citotoxicidade nos enterócitos das criptas e alterações nas enzimas intestinais. É pertinente referir que, nestes casos e sobretudo se o animal apresentar neutropénia, pode ocorrer translocação bacteriana e sépsis (Lana & Dobson, 2010). Como consequência dos efeitos

gastrointestinais pode ainda ocorrer depressão, desidratação e desequilíbrios eletrolíticos (Thamm & Vail, 2007; Couto, 2008; Vail, 2009; Lana & Dobson, 2010).

Além dos efeitos diretos dos fármacos nos diferentes sistemas de órgãos, a morte rápida das células tumorais pode causar alterações metabólicas súbitas (hiperuricemia, hiperfosfatemia e hipercalcemia) que podem conduzir sinais clínicos agudos, nomeadamente prostração, vômito e diarreia, mimetizando a toxicidade do fármaco. Esta síndrome é conhecida como síndrome da lise tumoral aguda (Couto, 2008).

10.3. Toxicidade Hepática

A toxicidade hepática induzida pela CIC em doses elevadas é conhecida, no entanto, a ocorrência de hepatite devido à CIC em dose baixa, raramente tem sido descrita (Muratori, Ferrari, Muratori, Granito & Bianchi, 2005; Subramaniam, Cader, Mohd, Yen, & Ghafor, 2013). Contudo, em medicina humana, existem descritos alguns casos pontuais de hepatite aguda (Subramaniam et al., 2013). Akay et al. (2006) referem um paciente que desenvolveu hepatite aguda após seis semanas de terapêutica com CIC em dose baixa (100mg/dia). Já Snyder, Heigh & Anderson (1993) referem um caso de toxicidade hepática, após cinco semanas de administração oral de CIC a 100mg/dia.

O mecanismo pelo qual a CIC pode provocar hepatite não está completamente esclarecido. Pensa-se que devido ao facto de a molécula ser amplamente metabolizada pelo sistema enzimático do citocromo P450, ocorrerá provavelmente um síndrome de obstrução sinusoidal, que leva a um efeito tóxico direto sobre as células sinusoidais do fígado, causando assim, necrose, obstrução e obliteração das veias hepáticas (McDonald et al., 2003; Jonge, Huitema, Beijnen & Rodenhuis, 2006).

Também a formação de RLOS e consequentemente o stresse oxidativo têm sido implicados nos efeitos hepatotóxicos da CIC (Motawi, Sadik, & Refaat, 2010). Isto porque, a biotransformação da CIC mediada pelo citocromo P450 leva à formação de mostarda fosforamida e acroleína, que são substâncias com elevada toxicidade e que têm potencial para produzir RLOS (como anião superóxido, o radical hidróxilo e o peróxido de hidrogénio) durante o seu metabolismo oxidativo, deprimindo os mecanismos de defesa antioxidante do fígado, que sendo um órgão metabolicamente ativo, é particularmente suscetível a RLOS (Ahmadi et al., 2011; Kern & Kehrer, 2002).

10.4. Toxicidade Renal

Os rins são os órgãos pelos quais a CIC e os seus metabolitos são excretados, e por isso estão particularmente suscetíveis à sua toxicidade. A CIC pode ser nefrotóxica tanto em humanos como em animais, podendo ser responsável por uma disfunção glomerular e tubular, causando proteinúria glomerular e tubular, como consequência da redução da taxa de filtração glomerular (Ghosh, Ghosh, D., Chattopadhyay & Debnath, 1999; Sugumar, Kanakasabapathy & Abraham, 2007).

Vários estudos demonstraram que as RLOS também desempenham um papel importante na toxicidade renal induzida pela CIC, tendo esta teoria sido suportada por resultados obtidos em estudos que mostraram o efeito protetor de antioxidantes como o ácido ascórbico e a melatonina na toxicidade renal induzida pela CIC (Manda & Bhatia, 2003).

10.5. Cistite Hemorrágica Estéril

A CHE é um efeito secundário que normalmente ocorre associado ao uso crónico de ciclofosfamida no cão, sendo raro no gato (5-25% dos cães e 1-3% dos gatos com tratamentos de ciclofosfamida de 18 semanas, em média) (Couto, 2008).

A par da CHE, o carcinoma das células de transição também tem sido relatado como um efeito secundário do tratamento crónico com ciclofosfamida em cães (Peterson et al., 1992; Charney, Bergman, Hohenhaus & McKnight, 2003; Moore, 2010), sugerindo-se que a ação inflamatória cumulativa da acroleína poderá aumentar o risco de desenvolvimento de carcinoma das células de transição da bexiga em cães (Mutsaers, Widmer & Knapp, 2003) e no Homem (Levine & Richie, 1989).

Os efeitos tóxicos da CIC na bexiga são atribuídos sobretudo à ação da acroleína que tem uma ação lesiva na mucosa vesical, provocando edema, necrose, hemorragia e fibrose (Couto, 2008; Lana & Dobson, 2010). Tem ainda sido proposto que as lesões uroteliais ocorrem devido à redução pela glutathione endógena, induzindo-se assim a formação de radicais livres, tais como o anião superóxido e radical hidroxilo, que iniciam a peroxidação lipídica, entre outras alterações celulares. Esta lesão é seguida de edema da bexiga, ulceração, neovascularização, hemorragia e necrose.

Face a esta hipótese, vários antioxidantes como o ácido 2-2-mercaptoetanosulfonato (MESNA), a amifostina, a N-acetilcisteína, o pentosano polissulfato sódico têm sido estudados de forma a se conseguir prevenir esta toxicidade. No Homem, bem como em cães, está descrita a utilização do MESNA concomitantemente com a ciclofosfamida ou a ifosfamida (Lana & Dobson, 2010; Best & Fry, 2013). Este composto liga-se à acroleína formando-se um tioéter inerte que consegue passar de forma inócua através do sistema urinário, limitando a lesão ao urotélio (Lana & Dobson, 2010).

Devido à inflamação da parede vesical, com consequente hemorragia, os sinais clínicos da CHE são normalmente hematúria, dor, polaquiúria e estrangúria, podendo persistir por várias semanas. A doença é geralmente refratária ao tratamento e a administração de CIC deve ser suspensa até que o problema esteja resolvido. É importante a realização de urocultura de modo a descartar uma possível infecção bacteriana, embora esta também possa ocorrer secundariamente à CHE.

Um vasto número de métodos foi proposto para reduzir a incidência e a gravidade da CHE, incluindo o uso simultâneo de furosemida (1mg/kg), o fornecimento de alimentação salgada ou a administração de um corticosteróide para promover a ingestão de água e a diurese, o uso de compostos quimioprotetores, tais como o MESNA, realizar a administração de CIC de manhã, de forma a promover o esvaziamento da bexiga ao longo do dia, e se utilizada a DMT dividir a dose total por várias administrações em vários dias. A maioria destes mecanismos foca-se em reduzir a concentração e o tempo de contacto da parede vesical com a urina que contém acroleína, porém, apenas existem evidências que suportam o papel da furosemida e do MESNA na redução da incidência de CHE (Best & Fry, 2013).

No que diz respeito ao tratamento, este passa pela interrupção da administração do fármaco, pela indução da diurese forçada com furosemida (2mg/kg PO BID), pela diminuição da inflamação vesical com prednisolona (0,5-1mg/kg PO SID) ou AINEs, e pela prevenção de infecção com antibioterapia, como a sulfadiazina-trimetropim (3-15 mg/kg PO BID) (Couto, 2008). Está também descrita a administração intravesical de dimetilsulfóxido (DMSO) a 25%, como forma de minorar os sinais clínicos (Tomoe, 2015). No caso de ocorrência da toxicidade, a CIC deverá ser substituída no protocolo quimioterápico por clorambucilo (Moore, 2010).

No que diz respeito à ocorrência de CHE como consequência da QM com CIC, alguns estudos demonstram que a CHE pode desenvolver-se após a administração de uma única DMT de CIC, bem como durante o tratamento metronómico a longo prazo (Lana et al., 2007; Elmslie et al., 2008).

A incidência estimada de CHE, após a administração de um protocolo de dosagem metronómica com CIC por mais de 30 dias é de cerca de 28,5%, 216 dias após o início do tratamento. Quanto à duração da sintomatologia, de acordo com um único estudo, esta poderá variar entre 21 e 136 dias (média de 60,5 dias) (Plumb, 2008).

Os resultados de um estudo farmacocinético com a utilização de CIC em cães mostrou que a exposição ao metabolito ativo através da administração oral ou endovenosa do fármaco era equivalente (Warry, Hansen, Gustafson & Lana, 2011). Além disto, no mesmo estudo, não foi observada uma diferença significativa no risco de desenvolvimento de CHE após a administração oral ou endovenosa da CIC.

Por sua vez, Best e Fry (2013), concluíram que o fracionamento da dose total de CIC praticada em protocolos de quimioterapia convencional, por três administrações em dias consecutivos, não resultou no desenvolvimento desta afeção, mesmo sem recurso à administração de diurético.

11. Classificação dos efeitos secundários

Existe um documento consensual de referência para descrever e classificar os efeitos secundários da quimioterapia em medicina veterinária: *Veterinary cooperative group – common terminology criteria for adverse events* (VCOG-CTCAE). Nas tabelas 2, 3, 4 e 5 descreve-se a classificação, em graus, dos efeitos hematopoiéticos e gastrointestinais mais relevantes na prática clínica, da toxicidade hepática e renal e da CHE.

Tabela 3 – Classificação, em graus, da toxicidade hematopoiética (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

Mielossupressão						
Graus		1*	2	3	4	5
Neutrófilos		≥1500/μL	1000-1499/μL	500-999/μL	<500/μL	Morte
Plaquetas		≥100000/ μL	50000-99999/ μL	25000-49000/ μL	<25000/ μL	
HCT	Cão	>30%	20 a 30%	15 a 20%	<15%	
	Gato	>25%	20 a 25%	15 a 20%	<15%	

*inclui valores até ao parâmetro de referência considerado normal para a espécie.

Tabela 4 – Classificação, em graus, da toxicidade hepática e renal (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

Toxicidade Hepática					
ALT	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
	Cão > 113 IU/L a 169,5 IU/L	Cão > 169,5 IU/L a 452 IU/L	Cão > 452 IU/L a 1130 IU/L	Cão > 1130 IU/L	-
	Gato > 105 IU/L a 131 IU/L	Gato > 131 IU/L a 157,5 IU/L	Gato > 157,5 IU/L a 210 IU/L	Gato > 210 IU/L	-
Toxicidade Renal					
Creatinina	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
	Cão > 1,6 mg/dL a 2,4 mg/dL	Cão > 2,4 mg/dL a 3,2 mg/dL	Cão > 3,2 mg/dL a 4,8 mg/dL	Cão > 4,8 mg/dL	-
	Gato > 1,9 mg/dL a 2,85 mg/dL	Gato > 2,85 mg/dL a 3,8 mg/dL	Gato > 3,8 mg/dL a 5,7 mg/dL	Gato > 5,7 mg/dL	-

Tabela 5 – Classificação, em graus, da toxicidade gastrointestinal (adaptado de VCOG-CTCAE, 2011).

Toxicidade Gastrointestinal					
Graus	1	2	3	4	5
Anorexia	Mudança de dieta para manter apetite	Anorexia ≤3 dias, sem perda de peso significativa	Anorexia >3 dias, perda de peso ≥10% ou má nutrição	Risco de vida	Morte
Náusea	Perda de apetite sem alteração dos hábitos alimentares	Grau 2 anorexia	Grau 3 anorexia	Grau 4 anorexia	
Vômito	<3 episódios em 24 horas	3-10 episódios em 24 horas, <5 episódios por dia durante 48 horas	Múltiplos episódios durante mais de 48 horas	Perigo de vida por colapso hemodinâmico	
Diarreia	Aumento de 2 defecações por dia, acima do normal, mas sem aumento da frequência, e consistência diminuída	Aumento de 3-6 defecações por dia, acima da frequência normal	Mais de 6 defecações acima da frequência normal e incontinência fecal > 48 horas	Perigo de vida por colapso hemodinâmico	

Tabela 6 – Classificação, em graus, da cistite hemorrágica estéril (adaptado de VCOG-CTCAE).

Cistite Hemorrágica Estéril					
Grau	1	2	3	4	5
	Assintomático; Hematúria/piúria microscópica, não necessitando a descontinuação do fármaco	Polaquiúria com disúria; hematúria macroscópica, transitória e que não necessita descontinuação do fármaco	Indicada transfusão; medicação antiespasmódica ou para controlo da dor; indicação para instilação intravesical; necessita descontinuação do fármaco	Hemorragia catastrófica; Intervenção não eletiva indicada	Morte

III. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SECUNDÁRIOS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE CICLOFOSFAMIDA EM REGIME DE QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA EM CÃES E GATOS – ESTUDO RETROSPETIVO DE 36 CASOS

1. Objetivo

Com a elaboração deste estudo retrospectivo pretendeu-se avaliar os efeitos secundários induzidos pela quimioterapia metronómica com ciclofosfamida, administrada por via oral, em cães e gatos, diagnosticados com neoplasias malignas, através da caracterização dos mesmos. Desta forma, procurou-se obter um melhor conhecimento da realidade clínica dos efeitos adversos em animais de companhia, com neoplasias malignas, submetidos a QM com ciclofosfamida quer em monoterapia quer em terapia combinada. Em termos clínicos, este estudo poderá contribuir com mais informação acerca desta modalidade terapêutica, tanto aos clínicos como aos proprietários, bem como facilitar a prevenção destes efeitos.

2. Materiais e Métodos

Este estudo inclui cães e gatos que foram submetidos a tratamento quimioterápico de neoplasias malignas espontâneas, com doses baixas de CIC, tanto em monoterapia como em terapia combinada com outros compostos: o meloxicam, o piroxicam e o fosfato de toceranib, no Hospital Veterinário Berna, desde de março de 2014 a março de 2016.

A pesquisa e identificação dos animais foi obtida através do registo de faturação da ciclofosfamida. A recolha de dados foi feita a partir da história clínica e análises laboratoriais dos animais, no sistema operativo Winvet®, utilizado no referido Hospital.

A CIC foi administrada na dose de 15mg/m² em cerca de 55,6% (20 em 36) dos animais, na dose de 10mg/m² em 8,3% (3 em 36) e na dose de 15mg/m² associada ao toceranib, em outros 11,1% (4 em 36). Ainda se administrou a CIC na dose de 10 ou 15 mg/m² associada a AINE [5,6% (2 em 36) e 19,4% (7 em 36) respetivamente]. Dos animais em que se administrou CIC combinada com AINEs, o meloxicam foi utilizado em 19,4% dos animais [7 em 36 (1 animal com CIC na dose de 10mg/m² e 6 animais na dose 15 mg/m²)] e o piroxicam em 5,6% [2 em 36 (um animal com CIC na dose de 10 mg/m² e outro na dose de 15 mg/m²)].

Nos protocolos em que se combinou a CIC com AINEs, o meloxicam foi utilizado na dose de 0,05mg/kg, SID e o piroxicam na dose de 0,3 mg/kg, SID. Relativamente ao fosfato de toceranib a posologia utilizada foi de 2,5 mg/kg, sendo administrado EOD (às segundas, quartas e sextas-feiras).

A caracterização dos 25 episódios de anemia observados foi realizada através da visualização do esfregaço sanguíneo destes animais.

2.1. Critérios de Inclusão

No estudo foram incluídos todos os cães e gatos, fêmeas ou machos, submetidos, pelo menos, a 21 dias de tratamento com QM com CIC e com seguimento realizado no mínimo três semanas após o início da terapêutica.

Os doentes que receberam protocolos citotóxicos com a DMT antes do início da quimioterapia metronômica foram incluídos neste estudo quando decorreu um período mínimo de pelo menos uma semana após a última dose da quimioterapia convencional e o início da QM.

Todos os animais deste estudo realizaram um hemograma completo e perfil bioquímico (medição da ALT e da creatinina) antes de se iniciar o protocolo de QM. O seguimento incluiu consulta, análises sanguíneas (hemograma completo e medição da ALT e da creatinina) e monitorização de ocorrência de efeitos adversos.

2.2. Critérios de Exclusão

Animais com neoplasia hepática, metástases hepáticas ou outras alterações hepáticas, foram excluídos deste estudo bem como animais com doença renal, neoplasia ou metástases renais.

Foram ainda excluídos deste estudo todos os animais que não apresentavam as análises pré tratamento com QM e/ou as análises de seguimento necessárias.

2.3. Parâmetros em análise

Os parâmetros em análise incluíram a caracterização da amostra em relação à espécie, raça, género, idade, tipo de neoplasia diagnosticada, a presença/ausência de metástases e sua localização, a realização de cirurgia para remoção do tumor primário, a realização prévia de quimioterapia com DMT e o tipo de protocolo de QM utilizado, a classificação dos efeitos secundários observados na amostra, a avaliação da sua frequência (%) e a descrição dos efeitos hematopoiéticos, renais, hepáticos e gastrointestinais identificados e ainda a ocorrência de CHE.

2.4. Classificação dos efeitos secundários

Os efeitos secundários considerados para avaliação foram a toxicidade hematopoiética (anemia, neutropénia e trombocitopénia), toxicidade gastrointestinal (GI), desenvolvimento de CHE, toxicidade renal e toxicidade hepática.

A identificação da mielotoxicidade foi realizada através da avaliação do valor de hematócrito, número de neutrófilos e de plaquetas; a toxicidade renal e a toxicidade hepática através do aumento, acima do valor de referência considerado normal para a espécie, dos níveis de creatinina plasmática e da enzima ALT, respetivamente. Os restantes efeitos secundários foram identificados através do descrito pelos proprietários e observado pelo médico veterinário no ato da consulta, nomeadamente: toxicidade gastrointestinal através da exibição de anorexia, náusea, vômito e/ou diarreia; CHE através da manifestação de hematúria, disúria e/ou polaquíúria e pela realização de urianálise.

O esfregaço sanguíneo de todos os seguimentos realizados em todos os animais foi visualizado ao microscópio ótico, permitindo desta forma caracterizar a anemia, quando esta ocorreu, e ainda avaliar a presença de agregação plaquetária, no caso das trombocitopénias.

Os efeitos secundários foram também caracterizados quanto à frequência de ocorrência e quanto à gravidade de acordo com o *Veterinary cooperative group – common terminology criteria for adverse events v1.1* (VCOG-CTCAE, 2011).

Após a descrição dos efeitos secundários observados, realizou-se a avaliação da relação/associação destes efeitos secundários com o protocolo utilizado, com a dose de CIC utilizada em monoterapia e com a realização de protocolos de DMT prévios à QM.

A tabela 7 descreve os valores sanguíneos a partir dos quais foram identificados, nos animais em estudo, a toxicidade hematopoiética, toxicidade renal e toxicidade hepática.

Tabela 7 – Valores sanguíneos para referência na avaliação da toxicidade hematopoiética, hepatotoxicidade e toxicidade renal, na amostra em estudo.

Hemograma		
Parâmetro	Cão	Gato
Hematócrito (anemia)	<39%	<28%
Neutrófilos (neutropénia)	<4,0 x 10 ³ /µL	<2,1 x 10 ³ /µL
Plaquetas (trombocitopénia)	<117 x 10 ³ /µL	<100 x 10 ³ µL
Bioquímicas Sanguíneas		
Parâmetro	Cão	Gato
Alanina aminotransferase (ALT)	>113 IU/L	>105 IU/L
Creatinina	>1,6 mg/ dL	>1,9 mg/ dL

A presença, antes do tratamento quimioterápico, de anemia, neutropénia e trombocitopénia, não foi contabilizada como efeito secundário para a mielotoxicidade quando estas se mantinham dentro dos mesmos valores, durante o tratamento com QM, a menos que tenham aumentado a sua gravidade após a administração quimioterápica, e desta forma possa existir relação de causalidade com a administração do fármaco. Quando se verificou este aumento, considerou-se como limite inferior para o cálculo do grau de toxicidade apresentado, o valor de hematócrito, neutrófilos e plaquetas apresentado nas análises prévias à quimioterapia.

Os animais com aumento nos valores da enzima hepática ALT e creatinina plasmática, antes do início do tratamento quimioterápico, não foram contabilizados na avaliação de toxicidade renal e toxicidade hepática, quando estes se mantinham durante o tratamento com QM, exceto se esta toxicidade teve agravamento após a terapêutica quimioterápica, e desta forma possa existir relação de causalidade com o fármaco. Quando se verificou este aumento, considerou-se como limite inferior para o cálculo do grau toxicidade hepática e renal apresentados, o valor de ALT e creatinina observados nas análises prévias à quimioterapia, respetivamente.

Como na QM, a administração dos fármacos é diária, foi considerada como uma sessão quimioterápica a administração do quimioterápico durante três semanas consecutivas, que nesta avaliação correspondeu a noventa e nove sessões de quimioterapia.

3. Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram registados no programa Microsoft® Excell (2013) e analisados com recurso ao programa informático estatístico SPSS Statistics 20.0 (IBM).

Para avaliação das relações entre as variáveis em estudo (associação dos efeitos secundários com o protocolo utilizado, com a dose de CIC utilizada em monoterapia e com a realização de protocolos de DMT prévios à QM) realizou-se o teste de Qui-Quadrado de Pearson, com a correção de Yates em casos com menos de cinco observações numa classe. A identificação de associações entre as diferentes variáveis foi realizada através do teste de Qui-Quadrado de Pearson, no qual são avaliadas duas hipóteses: a hipótese nula, onde as diferenças encontradas são devidas ao acaso; e uma hipótese alternativa, que refere existir associação entre as variáveis em estudo (Maroco, 2003). Para exclusão da hipótese nula e aceitação da hipótese alternativa, a probabilidade de significância (*p-value*) deverá ser igual ou inferior ao nível de significância determinado (α), neste caso correspondente a 0,05 ou 5%. O *p-value* corresponde ao menor valor de α a partir do qual se rejeita a hipótese nula, sendo por isso uma medida complementar do grau de certeza, a partir do qual assumimos como representativo, da população, o resultado obtido no nosso estudo, para a amostra populacional utilizada (Maroco, 2003). O nível de

significância corresponde ao chamado erro tipo I, ou seja, a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira, e que foi previamente definido como 5% (Callegari-Jacques, 2003; Maroco, 2003).

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

A amostra inclui 36 animais, 11 gatos (10 fêmeas e 1 macho) e 25 cães (12 fêmeas e 13 machos), sendo que 16 dos animais (10 cães e 6 gatos) apresentavam metástases nos linfonodos regionais e 7 (5 cães e 2 gatos) apresentavam metástases à distância, o que corresponde a 44,4% e 19,4% da amostra, respectivamente (gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 – Presença de metástases na amostra (n=36).

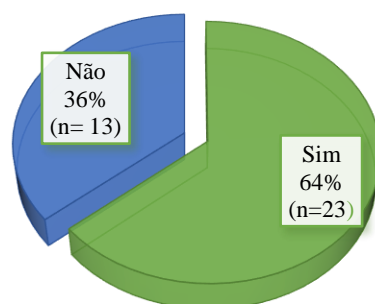
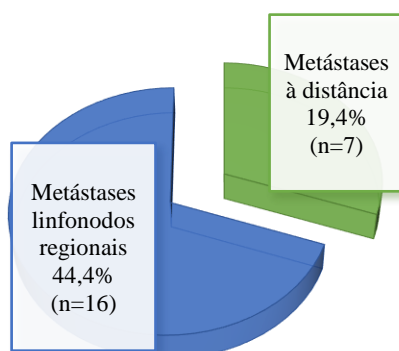


Gráfico 2 – Localização das metástases.



Relativamente à raça dos animais em estudo, nos gatos a raça mais representada foi o Europeu Comum [9/11 (81,8%)], existindo também 1 animal de raça (9,1%) Siamês e 1 (9,1%) de raça Angorá. Nos canídeos a amostra incluiu 7 (28%) animais Sem Raça Definida, 3 (12%) Boxers, 2 (8%) Caniche e um animal (4%) de cada uma das seguintes raças Cocker Spaniel, Doberman

Pinscher, Labrador Retriever, Golden Retriever, Fila de São Miguel, Fox Hound, Vizsla, Akita-Inu, Pastor Alemão, Rotweiler, Yorkshire Terrier, Pit Bull e Schnauzer Miniatura.

A média de idade da amostra foi de 11,2 anos (mínimo de 4 e máximo de 16 anos de idade) e a média de duração do tratamento foi de 96 dias (mínimo de 32 e máximo 224 dias), nos cães, e de 115,4 dias (mínimo de 32 e máximo de 215 dias), nos gatos.

A neoplasia mais representativa nos canídeos foi o sarcoma de tecidos moles (gráfico 3) – 6 em 25 (24%); nos gatos a neoplasia mais observada foi carcinoma da mama (gráfico 4) – 8 em 11 (73%).

De todos os animais que constituem a amostra populacional em estudo, 20 (11 em 25 cães e 9 em 11 gatos), foram submetidos a cirurgia para remoção do tumor primário, o que corresponde a 55,5% da amostra.

Gráfico 3 – Frequência relativa da distribuição do tipo de neoplasia nos cães da amostra em estudo (n=25).

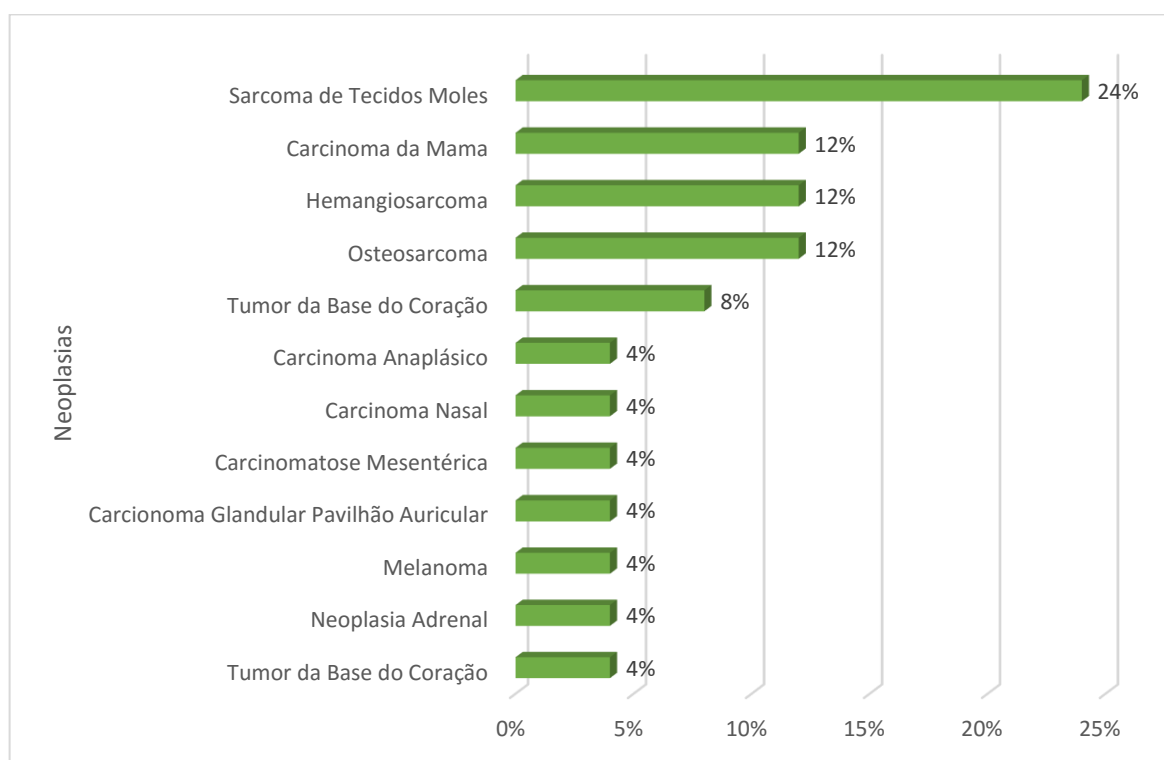
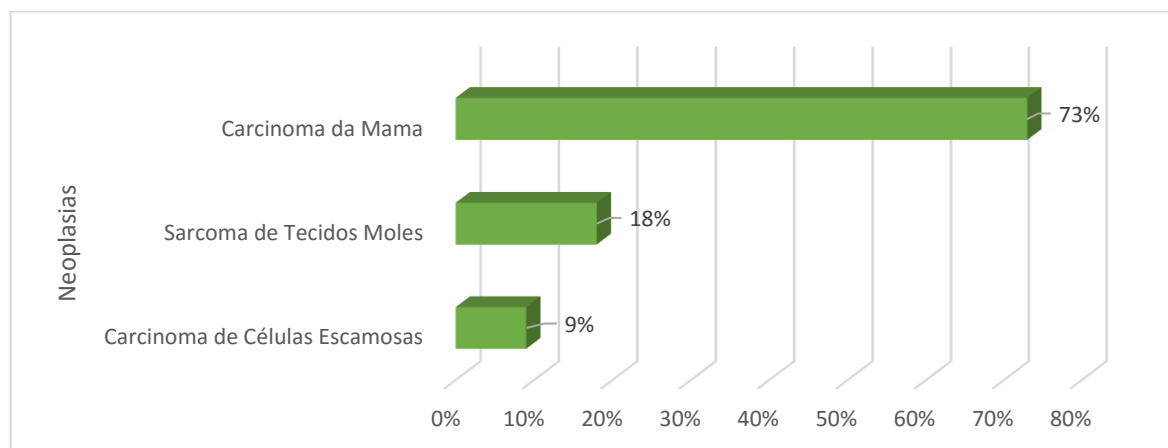


Gráfico 4 – Frequência relativa da distribuição do tipo de neoplasia nos gatos da amostra em estudo (n=11).



Quanto ao protocolo utilizado, utilizou-se a CIC em monoterapia e de forma combinada em 64% (23/36) e 36% (13/36) dos animais em estudo, respectivamente.

A frequência de utilização de cada composto encontra-se descrita no gráfico 5. Nos gráficos 6 e 7 estão apresentados, respectivamente, o número de cães e gatos submetidos aos diferentes protocolos de QM.

Gráfico 5 – Frequência relativa de utilização dos diferentes protocolos de QM, em toda a amostra.

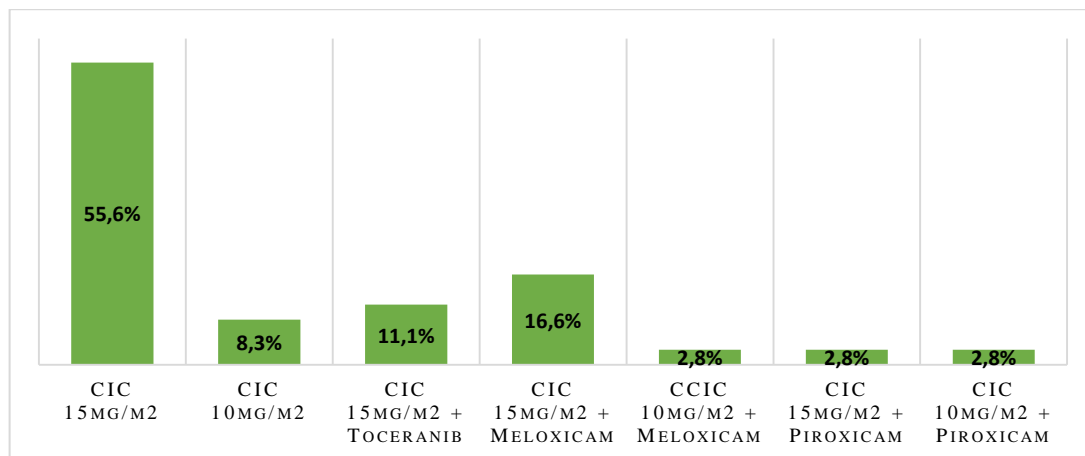


Gráfico 6 – Frequência absoluta de cães que foram submetidos aos diferentes protocolos de QM.

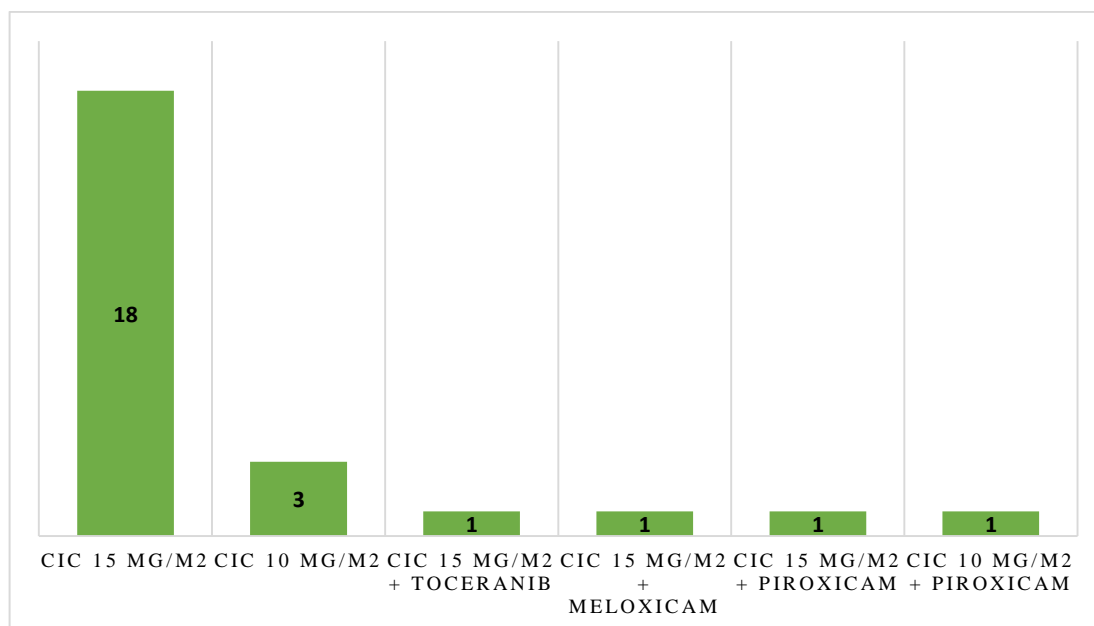
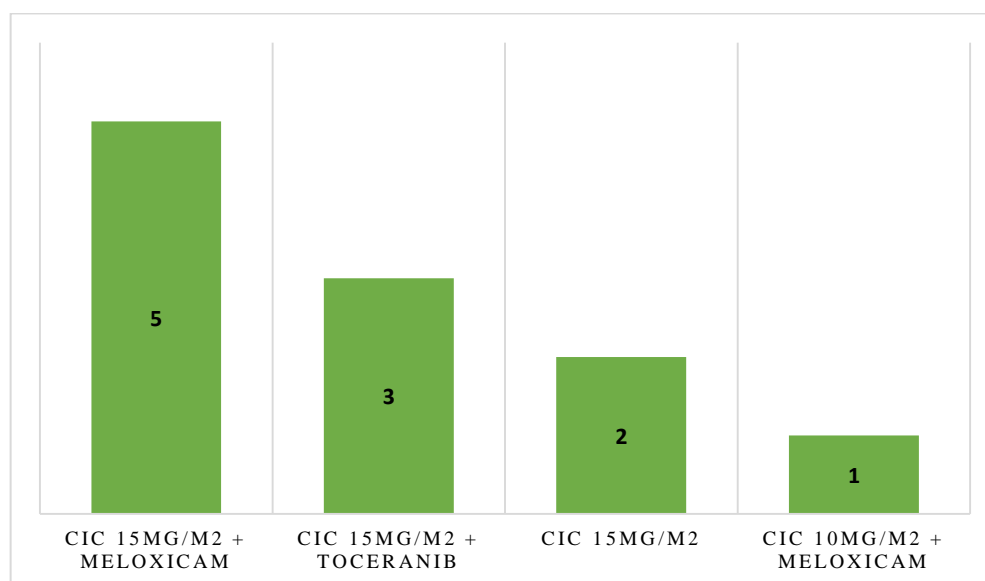


Gráfico 7 – Frequência absoluta de gatos que foram submetidos aos diferentes protocolos de QM.



Constatou-se que 12 dos animais (9 em 25 cães e 3 em 11 gatos) já haviam realizado anteriormente protocolos de quimioterapia convencional com a DTM e ainda que 4 animais (3 em 25 cães e 1 em 11 gatos) deste estudo realizaram um protocolo de C-S. Nos 3 cães o protocolo de C-S utilizado foi DMT com carboplatina seguida por QM com CIC a 15mg/m²; no gato foi utilizada a DMT com doxorubicina seguida por QM com CIC a 15mg/m².

4.2. Distribuição de frequências dos efeitos secundários

Verificou-se que 26 animais (6 em 11 gatos e 20 em 25 cães), correspondente a 72,2% da amostra, apresentaram pelo menos um efeito adverso relacionado com a QM.

A tabela 8 apresenta a distribuição dos efeitos secundários observados na amostra e a tabela 9 a distribuição do tipo de efeito secundário pelo grau de classificação atribuído, tendo em conta os critérios estabelecidos pelo VCOG-CTCAE (2011).

Tabela 8 – Frequência relativa e absoluta dos efeitos secundários observados.

Efeito Secundário	Frequência relativa dos efeitos secundários observados (n=101)	Frequência absoluta (n=36)	Cães (n=25)	Gatos (n=11)
Toxicidade hematopoiética	29,70%	15	13	2
Toxicidade hepática	15,84%	10	9	1
Toxicidade renal	12,87%	8	5	3
Toxicidade GI	39,60%	16	11	5
CHE	1,98%	2	2	0

Foram assim observados 101 efeitos secundários em toda a amostra, o que corresponde a 30 episódios de toxicidade hematopoiética (em 13 cães e 2 gatos), 16 de toxicidade hepática (em 9 cães e 1 gato), 13 de toxicidade renal (em 5 cães e 3 gatos), 40 episódios de toxicidade GI (em 11 cães e 5 gatos) e 2 episódios de CHE (2 cães), observando-se uma maior tendência de toxicidade GI nos gatos e de toxicidade hematopoiética nos cães (55,6% e 35,6% respetivamente).

Estes 101 efeitos secundários, ocorreram ao longo do período de tratamento, ou seja, ao longo das sessões de QM (uma sessão corresponde à administração diária do quimioterápico durante três semanas consecutivas como já mencionado) a que os animais foram sujeitos.

Tabela 9 – Frequência relativa e absoluta dos efeitos secundários observados pelo grau de classificação atribuído.

Efeito Secundário	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Toxicidade hematopoiética	70% (21 em 30)	20% (6 em 30)	6,7% (2 em 30)	3,3% (1 em 30)	-
Toxicidade hepática	25% (4 em 16)	56,25% (9 em 16)	12,5% (2 em 16)	6,25% (1 em 16)	-
Toxicidade renal	76,92% (10 em 13)	23,08% (3 em 13)	-	-	-
Toxicidade GI	65% (26 em 40)	20% (9 em 40)	15% (5 em 40)	-	-
CHE	-	50% (1 em 2)	50% (1 em 2)	-	-
Total	60,4%	27,72%	8,91%	2,97%	-

Em 18 animais (14 cães e 4 gatos) observou-se a ocorrência de mais do que um efeito secundário em simultâneo, o que corresponde a 50% da amostra. Tendo assim em consideração a possibilidade de um único animal apresentar diversos efeitos secundários ao longo do período de tratamento com QM, na tabela 10 descrevem-se quais os efeitos observados em simultâneo, no mesmo animal, e a sua respetiva frequência relativa.

Tabela 10 – Efeitos secundários observados em simultâneo no mesmo animal e respetiva frequência relativa e absoluta.

Conjunto de Efeitos Secundários	Frequência relativa	Frequência absoluta de:		
		Animais (n=36)	Cães (n=25)	Gatos (n=11)
Anemia, Neutropénia e Toxicidade GI	5,5%	1	1	0
Toxicidade hepática e Anemia	22,325%	4	4	0
Toxicidade renal e Anemia	5,5%	1	1	0
Hepatotoxocidade e Toxicidade GI	11,225%	2	2	0
Anemia e Toxicidade GI	11,225%	2	2	0
Anemia, Toxicidade hepática e Toxicidade GI	11,225%	2	2	0
Anemia, Toxicidade renal e Toxicidade GI	5,5%	1	0	1
Anemia, Toxicidade renal, Toxicidade GI e CHE	5,5%	1	1	0
Toxicidade renal, Toxicidade GI e CHE	5,5%	1	1	0
Toxicidade renal e Toxicidade GI	5,5%	1	0	1
Anemia, Toxicidade renal e Trombocitopénia	5,5%	1	0	1
Anemia, Toxicidade hepática, Toxicidade renal e Toxicidade GI	5,5%	1	0	1

1.1.1. Toxicidade Gastrointestinal

Como se pode verificar na tabela 9 a toxicidade GI apresentou-se como o efeito secundário mais frequente neste estudo, tendo-se contabilizado 40 episódios, que ocorreram em 16 (44,4%) dos animais em estudo. Os episódios referidos foram identificados através dos seguintes sinais clínicos: vômito (16 em 40), náusea (1 em 40), diarreia (11 em 40) e anorexia (12 em 40). No gráfico 8 apresentam-se o número de episódios de cada um destes sinais e a classificação da sua gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011). Nos gráficos 9 e 10, apresentam-se de forma separada, o número de episódios de toxicidade GI e a sua classificação de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em cães e gatos, respetivamente.

Gráfico 8 – Frequência absoluta dos episódios de toxicidade gastrointestinal e respetiva gravidade, de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.

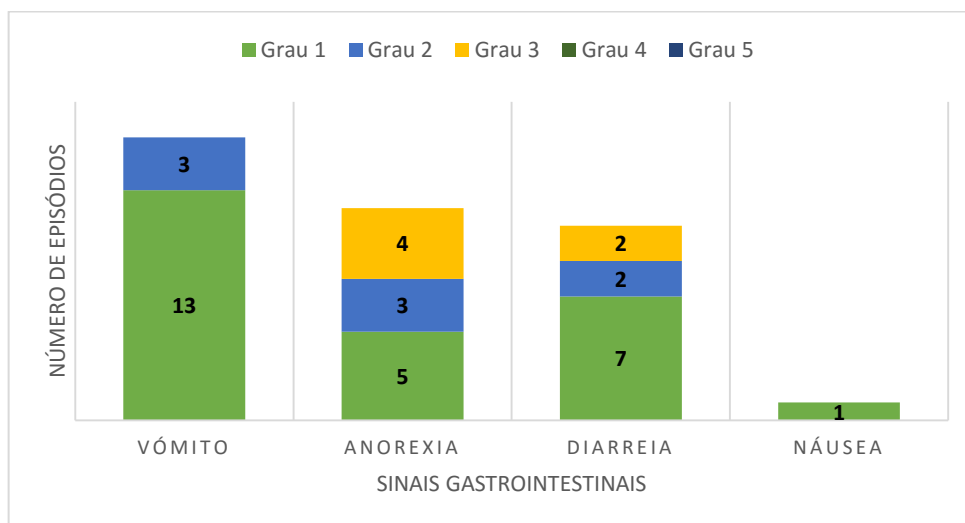


Gráfico 9 – Frequência absoluta dos episódios de toxicidade gastrointestinal e respetiva gravidade, de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães da amostra.

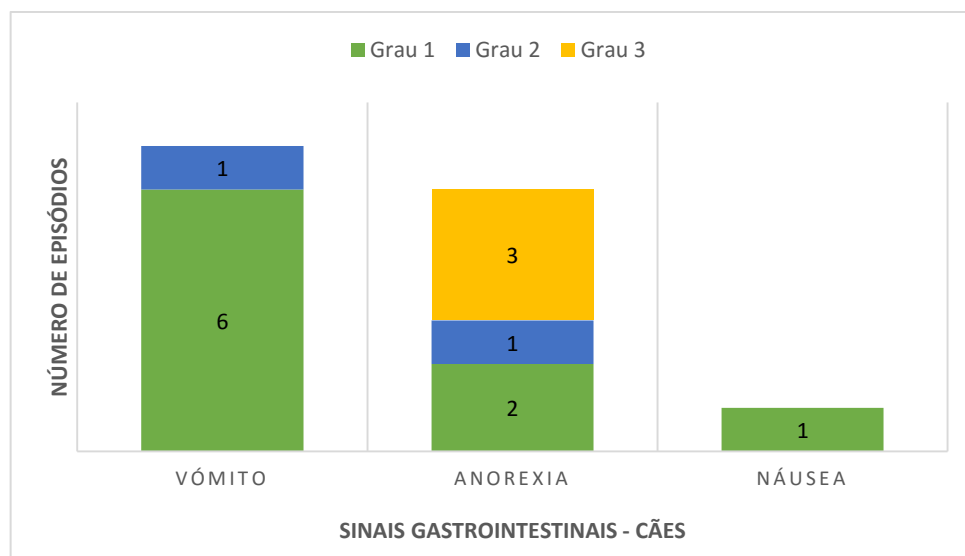
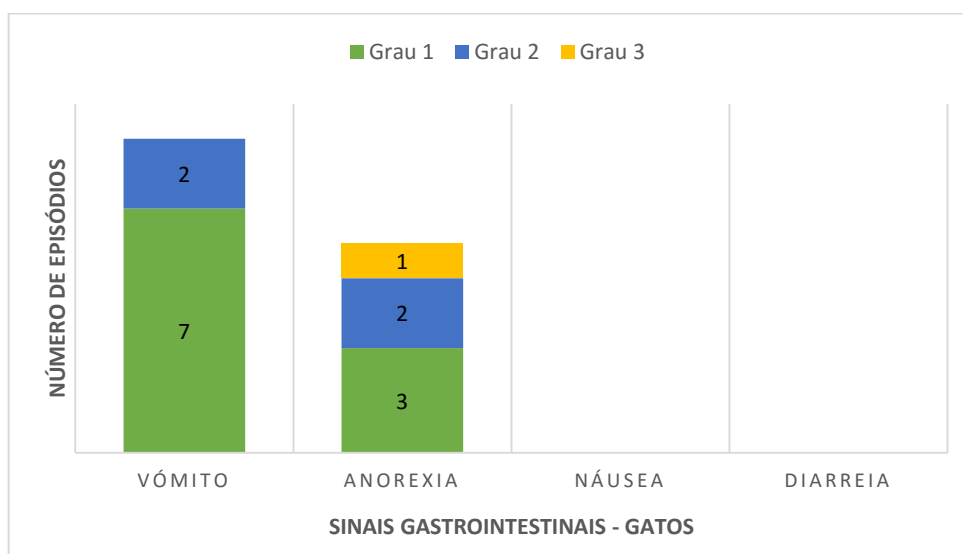


Gráfico 10 – Frequência absoluta dos episódios de toxicidade gastrointestinal e respetiva gravidade, de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos gatos da amostra.



1.1.2. Toxicidade Hematopoiética

A toxicidade hematopoiética foi o segundo efeito secundário mais frequente tendo-se contabilizado 30 episódios, em 15 animais da amostra (42%).

A anemia foi o efeito secundário mais representativo (83,3% - 25 em 30 episódios), seguida da neutropénia (10% - 3 em 30 episódios) e da trombocitopénia (6,7% - 2 em 30 episódios).

Verificou-se através da visualização do esfregaço sanguíneo que 9 episódios corresponderam a anemia regenerativa e 16 episódios a anemia não regenerativa. Apenas um dos animais que apresentou mais do que um episódio de anemia ao longo do tratamento, teve o primeiro episódio classificado como anemia não regenerativa e os dois seguintes de anemia regenerativa. Os restantes mantiveram sempre a mesma classificação do tipo de anemia observado, nos diferentes episódios apresentados.

A gravidade dos episódios de mielotoxicidade, classificados de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), está apresentada no gráfico 11. Nos gráficos 12 e 13, a classificação feita de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), está apresentada em função da espécie, cães e gatos, respetivamente.

Gráfico 11 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hematopoiética e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.

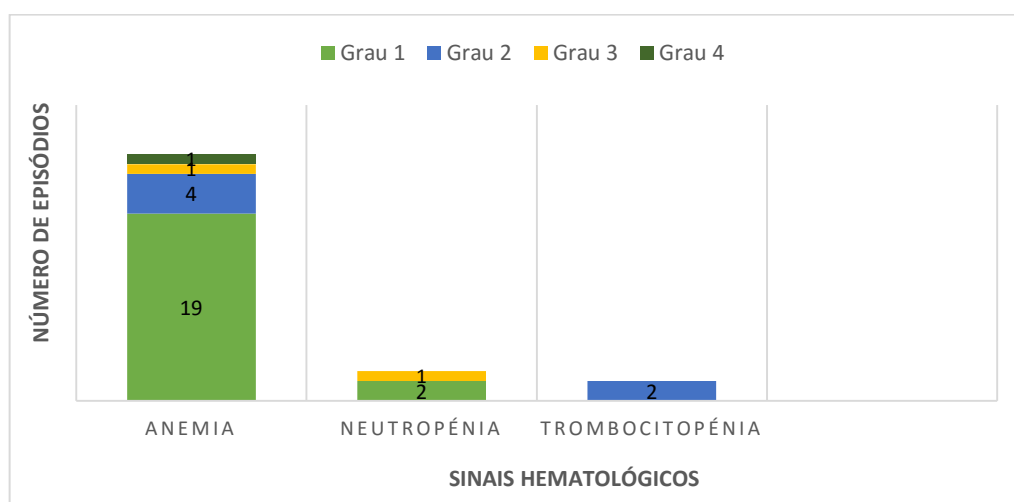


Gráfico 12 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hematopoiética e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães da amostra.

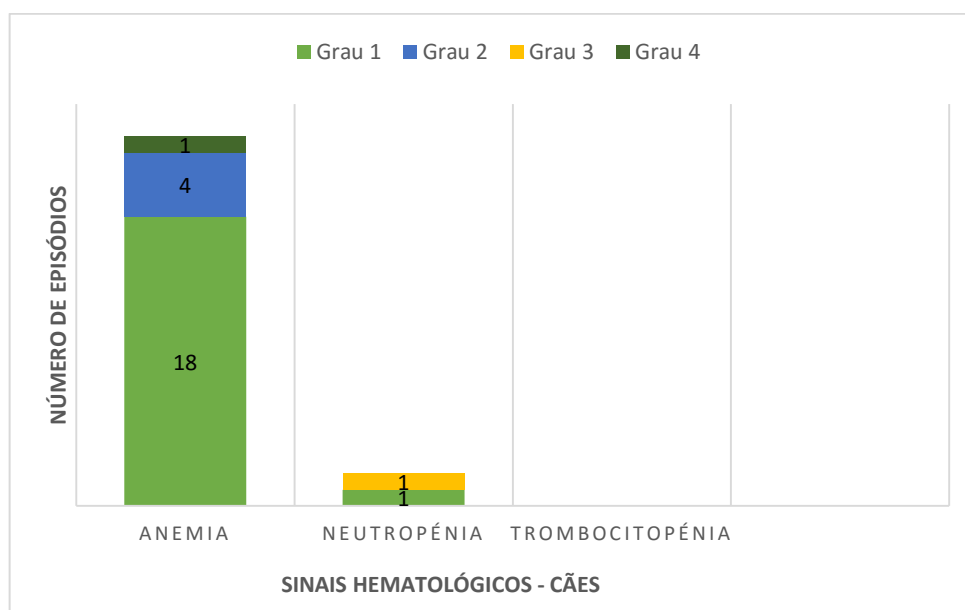
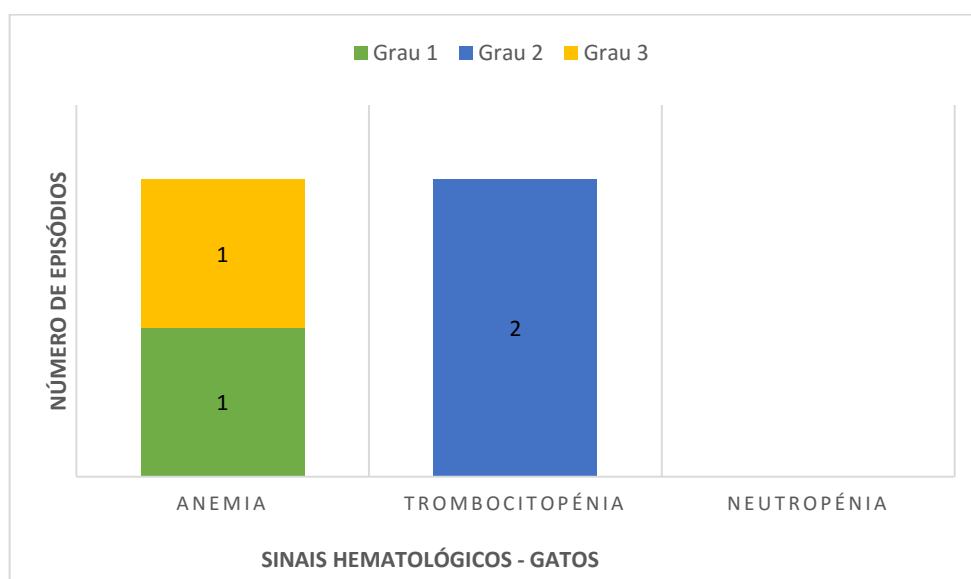


Gráfico 13 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hematopoiética e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos gatos da amostra



1.1.3. Toxicidade Hepática

Relativamente à toxicidade hepática, verifica-se também (tabela 9) que esta teve alguma expressividade na amostra, identificando-se 16 episódios relativos a este efeito secundário, em 10 em 36 animais da amostra. No gráfico 14 apresenta-se a frequência absoluta dos episódios de toxicidade hepática em função do grau de gravidade atribuído de acordo com o VCOG-CTCAE (2011). No gráfico 15, apresenta-se a frequência absoluta de ocorrência dos episódios referidos pelo grau de gravidade atribuído de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), de forma separada, em cães e gatos.

Gráfico 14 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hepática e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.

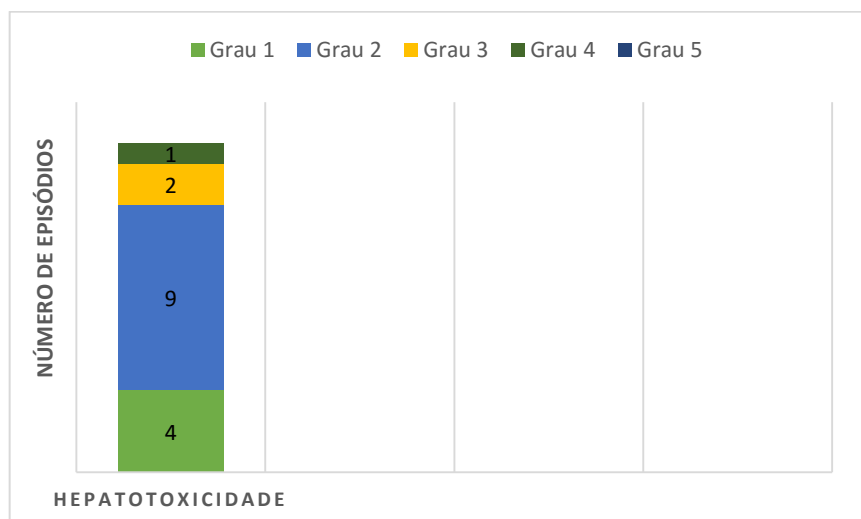
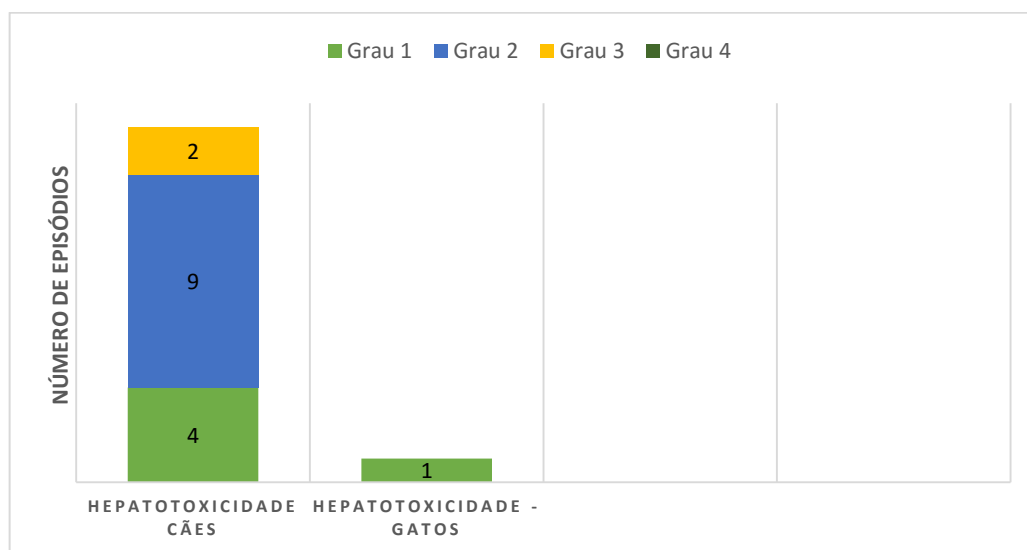


Gráfico 15 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade hepática e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães e gatos da amostra, separadamente.



1.1.4. Toxicidade renal

Quanto à toxicidade renal foram identificados 13 episódios em 8 dos 36 animais que constituem a amostra. A frequência absoluta dos episódios, em função da sua classificação segundo o VCOG-CTCAE (2011), encontra-se apresentada no gráfico 16; no gráfico 17 apresenta-se a frequência absoluta dos episódios em função da classificação dos episódios, de forma separada, em cães e gatos.

Gráfico 16 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade renal e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), em toda a amostra.

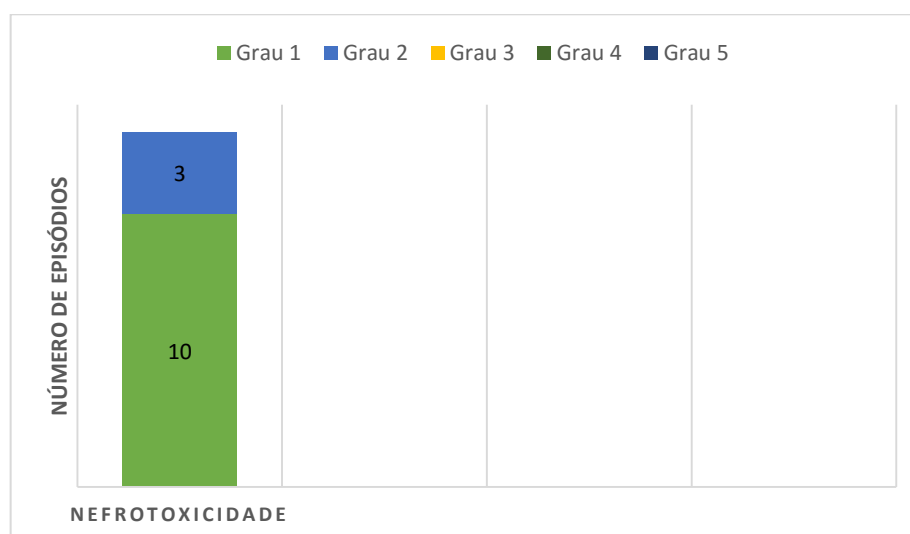
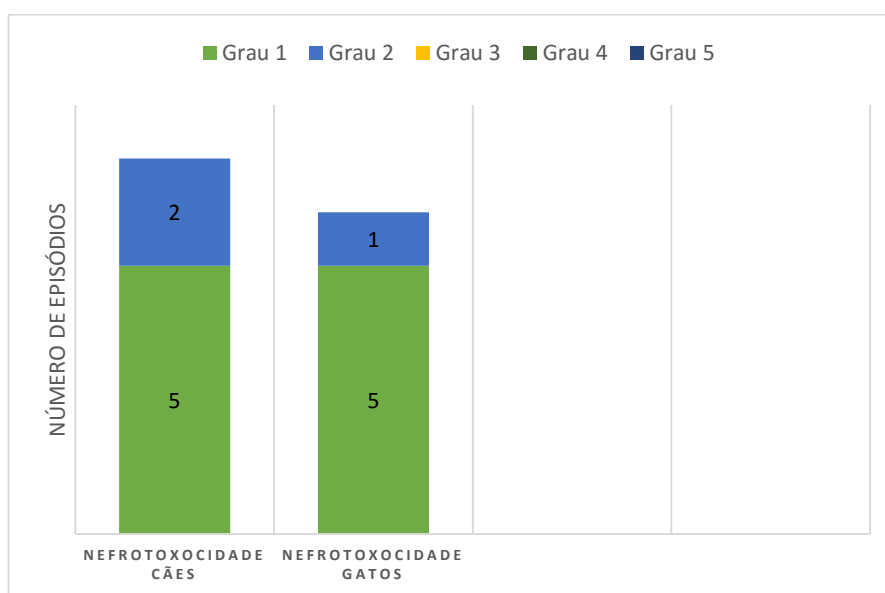


Gráfico 17 – Frequência absoluta dos episódios relativos a toxicidade renal e respetiva gravidade de acordo com o VCOG-CTCAE (2011), nos cães e gatos da amostra, separadamente.



1.1.5. Cistite Hemorrágica Estéril

Verificou-se a ocorrência de CHE em 2 canídeos, fêmeas, da amostra, tendo sido este efeito secundário classificado em grau 2 num dos animais e em grau 3 noutro, de acordo com os critérios estabelecidos pelo VCOG-CTCAE (2011).

No caso da CHE de grau 3, os primeiros sinais surgiram cerca de 1 mês após início da QM, tendo a ciclofosfamida sido descontinuada nesta cadela, cerca de 3 meses após a manifestação dos primeiros sinais. A sintomatologia manteve-se durante cerca de 90 dias.

Relativamente ao outro caso, cujo efeito secundário foi classificado em grau 2, a sintomatologia surgiu cerca de 50 dias após o início da QM. Nesta cadela, os sinais mantiveram-se durante cerca de 46 dias.

A descrição mais detalhada destes dois casos encontra-se no anexo 2.

5. Ocorrência de efeitos secundários em função do protocolo e dose utilizados

Na tabela 11 apresenta-se o número de animais que desenvolveram efeitos secundários, tendo em conta o protocolo de QM utilizado. É importante ter em atenção que um animal pode exibir sinais de toxicidade em mais do que um sistema orgânico e, desta forma, apresentar mais do que um episódio de toxicidade, tal como se pode verificar pela análise da tabela 11.

Tabela 11 – Frequência absoluta do número de animais que desenvolveram efeitos secundários de acordo com o protocolo de QM utilizado e com o tipo de toxicidade induzida.

Protocolo		Toxicidade Hematopoiética	Toxicidade GI	Toxicidade renal	Toxicidade hepática	CHE
CIC 15mg/m ²	20	11	8	3	7	1
CIC 10mg/m ²	3	1	1	1	2	1
CIC 10mg/m ² + Meloxicam	1	0	1	0	0	0
CIC 10mg/m ² + Piroxicam	1	0	0	0	0	0
CIC 15mg/m ² + Fosfato de toceranib	4	3	2	2	1	0
CIC 15mg/m ² + Piroxicam	1	0	1	0	0	0
CIC 15mg/m ² + Meloxicam	6	0	1	0	0	0
Total	36	15	14	6	10	2

Da análise da tabela 11, verifica-se que foi no protocolo com CIC a 15mg/m² que os efeitos secundários ocorreram em mais animais, seguido do protocolo com CIC a 15mg/m² combinada com fosfato de toceranib e do protocolo com CIC a 10mg/m² em monoterapia.

6. Relação entre a ocorrência de efeitos secundários e o protocolo utilizado

Na tabela 12 apresenta-se o valor de significância obtido pelo teste Qui-Quadrado de Pearson com correção de Yates (quando necessário), na análise estatística da associação entre a ocorrência de toxicidade e protocolo de QM utilizado – CIC em monoterapia ou CIC em terapia combinada.

Tabela 12 – Significância estatística da associação entre a ocorrência de efeitos secundários e o protocolo de QM, pelo teste de Qui- Quadrado, com correção de Yates

Protocolo utilizado	Sem ocorrência de efeitos secundários (nº animais)	Ocorrência de efeitos secundários (nº animais)	<i>p-value</i>	Nível de Significância
CIC em monoterapia (10 ou 15mg/m²) n=23	3	20	0,002	Com significância (p≤0,05)
CIC em terapia combinada (10 ou 15mg/m² com AINE's ou Fosfato de toceranib) n=13	8	5		

Segundo o observado, pode-se concluir que a associação entre a ocorrência de efeitos secundários e o protocolo de QM utilizado, apresenta significância estatística, pelo que, neste caso, rejeita-se a hipótese nula, e por isso há associação entre as variáveis.

Na tabela 13 apresenta-se o valor de significância obtido pelo teste Qui-Quadrado de Pearson com correção de Yates (quando necessário), na análise estatística da associação entre a ocorrência de toxicidade e a dose de CIC quando utilizada em monoterapia - 10 ou 15 mg/m².

Tabela 13 – Significância estatística da associação entre a ocorrência de efeitos secundários e a dose de CIC utilizada em monoterapia, pelo teste de Qui- Quadrado, com correção de Yates

Dose utilizada	Sem ocorrência de efeitos secundários (nº animais)	Ocorrência de efeitos secundários (nº animais)	<i>p-value</i>	Nível de Significância
10mg/m ²	0	3	0,266	Sem significância (p>0,05)
15mg/m ²	4	16		

Verifica-se assim que não existiu evidência estatística de associação entre a ocorrência de efeitos secundários e a dose de CIC quando utilizada em monoterapia, pelo que, se aceita a hipótese nula.

7. Relação entre a ocorrência de efeitos secundário e a realização prévia de protocolos com DMT

Foi também avaliada a relação entre a ocorrência de efeitos secundários e a realização prévia de protocolos de DMT. Na tabela 14 encontra-se o valor de significância (*p-value*) obtido na avaliação da relação entre estas duas variáveis.

Tabela 14 – Significância estatística da associação entre a ocorrência de efeitos secundários e a realização prévia de protocolos com DMT, pelo teste de Qui- Quadrado, com correção de Yates.

Número de animais que realizaram previamente protocolo com DMT	Número de animais que realizaram previamente protocolo com DMT e desenvolveram efeitos secundários	Número de animais que realizaram previamente protocolo com DMT e não desenvolveram efeitos secundários	<i>p-value</i>	Nível de Significância
16	11	5	0,936	Sem significância (p>0,05)

Verifica-se assim que não existiu evidência estatística de associação entre a ocorrência de efeitos secundários e a realização prévia de protocolos de DMT, pelo que, também neste caso, se aceita a hipótese nula, de que as diferenças identificadas se devem ao acaso.

8. Discussão

De uma forma geral, grande parte dos autores refere que os efeitos secundários à quimioterapia são pouco expressivos em animais, representando uma prevalência de 5 a 40%, comparativamente aos efeitos observados no Homem, com prevalências de 75 a 100% (Matos & Pereira, (2005); Couto, 2008). Por seu lado, quando falamos de QM em animais de companhia, alguns dos autores vão ainda mais além e esta surge na literatura associada a uma toxicidade mínima e significativamente menor à toxicidade devida à utilização de protocolos com DMT (Mutsaers, 2007; Marchetti et al., 2012).

No presente estudo, a percentagem de efeitos secundários obtida, nos animais que compõe a amostra, foi de 72,2% (26 em 36). Este resultado é superior ao descrito noutros trabalhos, como por exemplo, no realizado por Elmslie et al. (2008), em que dos 30 cães submetidos a QM com CIC (10 mg/m²/SID) e piroxicam (0,3 mg/kg/SID), apenas 12 (40%) desenvolveram efeitos secundários relacionados com a terapêutica. No caso dos estudos desenvolvidos por Burton et al. (2011), os quais administraram CIC (12,5 e 15 mg/m²/SID) em 11 cães, e por Marchetti et al. (2012), os quais administraram CIC (25mg/m²/SID) associada a celecoxib (2mg/kg) em 15 cães, não foi identificada a presença de toxicidade renal, hepática ou hematopoiética. Já no trabalho levado a cabo por Mitchell et al. (2012), no qual foi administrada CIC (15mg/m²/SID) combinada com toceranib (2,75mg/kg/SID/dias alternados), verificou-se a ocorrência de toxicidade gastrointestinal, hematopoiética e ainda letargia, em 15% dos animais, aos 28 dias de tratamento.

As explicações possíveis para a existência desta elevada representatividade de efeitos secundários neste trabalho, poderá dever-se ao estado clínico dos animais e à própria evolução da doença (64% dos animais da amostra apresentavam metástases dos quais 19,4% são metástases à distância e 44,4% nos linfonodos regionais).

No entanto, é importante ter em atenção as diferenças existentes entre estes estudos e o presente trabalho, que podem justificar as diferenças observadas na percentagem de efeitos secundários obtida, nomeadamente no que concerne a: 1) duração do tratamento – no trabalho de Burton et al. (2011) esta duração foi de apenas de 28 dias; no de Mitchell et al. (2012) o tratamento combinado da CIC com toceranib foi de apenas 6 semanas; 2) dose e os protocolos utilizados – Burton et al. (2011) apenas utilizaram a CIC em monoterapia nas doses de 12,5 e 15 mg/m²/SID; enquanto por sua vez, Marchetti et al. (2012), utilizaram CIC a 25mg/m²/SID associada a celecoxib (2mg/kg); 3) variedade das neoplasias apresentadas pelos animais em estudo - Elmslie et al. (2008) e Burton et al. (2011), por exemplo, apenas estudaram animais diagnosticados com Sarcoma de Tecidos Moles; 4) tipo de controlo analítico realizado no

estudo e respetiva frequência - Elmslie et al. (2008) apenas reavaliaram os animais a cada 3 meses após o início da QM, não especificando em que consistia essa reavaliação; Burton et al. (2011) realizavam apenas um hemograma completo aos 14 e 28 dias após o início da QM, já Marchetti et al. (2012), realizaram a cada mês um hemograma completo, um painel bioquímico (medição dos níveis de ALT, fosfatase alcalina (FAS), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubina total, creatinina, ureia e proteínas séricas totais) e ainda urianálise com ratio proteína/creatinina urinárias; Mitchell et al. (2012) realizaram um hemograma completo aos dias 7, 14, 28, 42 e 56 e um painel bioquímico e urianálise aos dias 28 e 56.

No que diz respeito à gravidade dos episódios de toxicidade observados, os resultados obtidos já estão de acordo com o descrito na bibliografia (Elmslie et al., 2008; Lana et al., 2007; Pasquier et al., 2010), dado que a maioria dos efeitos observados foram ligeiros – 60,4% dos efeitos secundários observados foram classificados em grau 1 e 27,72% em grau 2. A classificação de grau 3 e 4 foi atribuída apenas a 8,91% e 2,97% dos episódios, respetivamente, não tendo existido nenhum episódio classificado no grau 5.

Os efeitos secundários mais frequentemente determinados na amostra foram a toxicidade gastrointestinal e a toxicidade hematopoiética, com percentagens de 39,6% e de 29,7% respetivamente. Esta observação vai ao encontro do esperado uma vez que quer o trato gastrointestinal, quer a medula óssea, são tecidos com elevado índice mitótico, e por isso mais suscetíveis aos fármacos usados no tratamento (Couto, 2008; Vail, 2009; Frimberger, 2010).

No estudo a toxicidade hematopoiética manifestou-se por anemia, neutropénia e trombocitopénia, em 15 animais da amostra (13 cães e 2 gatos). Dos 30 episódios de manifestação desta toxicidade, 25 deles corresponderam a situações de anemia, 3 a neutropénia e 2 a trombocitopénia.

Como se referiu ao longo da revisão bibliográfica desta dissertação, a maioria dos autores refere uma baixa ocorrência de anemia secundária à quimioterapia, dado que os eritrócitos têm um tempo de maturação na medula óssea (MO) de 7 dias e o seu tempo de semivida biológico ($t_{1/2}$) é de 120 dias no cão e 70 dias no gato. Desta forma, para se verificar uma anemia secundária à quimioterapia, deverão decorrer cerca de 3 a 4 meses após a administração do fármaco (Couto, 2008; Frimberger, 2010). No entanto, neste estudo verificou-se que a anemia foi a situação mais frequente dentro da toxicidade hematopoiética e, em alguns animais, a sua ocorrência deu-se no primeiro e segundo seguimentos realizados após início da terapêutica, ou seja, 3 e 6 semanas após o início da QM, respetivamente. Esta situação poderá dever-se não apenas à ação do quimioterápico, mas à própria ação da neoplasia, existindo uma maior manifestação de anemia, por exemplo por ocorrência simultânea de um síndrome paraneoplásico (anemia da doença

crônica, anemia hemolítica imuno-mediada, perda crônica de sangue, mielotísica ou anemia hemolítica microangiopática), uma vez que 19 dos episódios de anemia foram classificados, através da observação do esfregaço sanguíneo, em anemia não regenerativa. A ação de alguns fatores relacionados com o animal, como a má nutrição, idade do animal e alteração da função orgânica, também pode ser uma explicação para os valores obtidos neste estudo (Couto, 2008; Mellanby, 2010; Heading, Brockley & Bennett, 2011).

A anemia é a forma de toxicidade hematopoiética mais frequente neste estudo, ocorrendo em 13 dos 15 animais que apresentaram toxicidade hematopoiética, dos quais apenas 2 são gatos. No estudo realizado por Leo et al. (2014), para avaliação da QM com CIC em gatos com neoplasias malignas, apenas um episódio de anemia (grau 2) foi identificado num dos 15 animais da amostra; este animal apresentava concomitantemente insuficiência renal. Na verdade, no presente trabalho, apenas 4 em 11 gatos (36%), apresentaram toxicidade hematopoiética e/ou hepática e/ou renal. Estas observações parecem sugerir que os gatos que recebem doses metronômicas de CIC podem não necessitar de re-avaliações do hemograma e até da creatinina e ALT, tão frequentemente como os cães. Poderá assim ser possível reduzir o stresse da terapia, ao limitar as punções venosas nos gatos. No entanto, tanto no presente trabalho, como no estudo de Leo et al. (2014) apenas um número limitado de gatos foram avaliados, de modo que esta afirmação exige uma validação adicional. Nesta altura é também importante referir que existe um número muito limitado de estudos acerca da utilização de QM em gatos, sendo esta uma área de investigação, com necessidade de ser desenvolvida. Até ao momento, que seja do nosso conhecimento, apenas existe um estudo sobre a avaliação da toxicidade de QM em gatos, realizado por Leo et al. (2014).

Já no que diz respeito à neutropénia, ela surge descrita na bibliografia como uma forma de toxicidade mais frequentemente associada à quimioterapia dado que o tempo de circulação dos neutrófilos na MO é de 6 dias, o seu $t_{1/2}$ de 4-8 horas e tem um *nadir* de 5-10 dias pós-sessão (Couto, 2008). Porém, neste trabalho foram identificados apenas três episódios de neutropénia em 2 dos 36 animais (5,5%), sendo que apenas um dos animais apresentou neutropénia nas primeiras três semanas após o início da terapêutica (no primeiro seguimento realizado); o outro apresentou os dois episódios de neutropénia no terceiro e quarto seguimentos realizados, ou seja, 9 e 12 semanas após iniciar a QM, respetivamente. O resultado obtido para a ocorrência de neutropénia é inferior ao que surge relatado no trabalho desenvolvido por Mitchell et al. (2012), já referido anteriormente, no qual se verificou a existência de neutropénia, em 10% dos animais da amostra (1 em 10), aos 42 dias de tratamento. A menor expressão de neutropénia, poderá também resultar do maior tamanho da amostra do presente estudo ou haver condicionantes imuno estimulantes na população estudada, como inflamação, infeção, etc.

No entanto, existem também exemplos na literatura, também eles já referidos acima, nos quais não se identificaram episódios de toxicidade hematopoiética, em qualquer uma das suas formas (anemia, neutropénia ou trombocitopénia). Tendo em consideração as grandes diferenças obtidas nos diferentes estudos, podemos então considerar, que o resultado obtido para a neutropénia no presente trabalho, se encontra dentro do intervalo obtido pelos estudos anteriormente referidos (0-10%).

Quanto à trombocitopénia, em termos temporais, esta é a segunda alteração hematológica a ocorrer após exposição a quimioterápicos, uma vez que as plaquetas apresentam um tempo de circulação na MO de 3 dias, um $t_{1/2}$ de 4-6 dias e um *nadir* de 1 a 2 semanas (Couto, 2008). De acordo com Lana & Dobson (2010), a trombocitopénia associada à quimioterapia raramente é significativa a ponto de causar sintomatologia. No presente estudo verificaram-se apenas dois episódios de trombocitopénia, sendo ambos observados no mesmo animal (1/36 [2,8%]), e ocorreram no quinto e sexto seguimentos realizados, o que corresponde à décima quinta e décima oitava semanas após se iniciar a QM. Este animal não apresentou qualquer sintomatologia associada à trombocitopénia nos dois episódios que exibiu. Mitchell et al. (2012), no seu estudo, utilizando o protocolo metronómico de CIC (15mg/m²/SID) combinada com toceranib (2,75mg/kg/SID/dias alternados), identificaram uma incidência de trombocitopénia, aos 28 dias de tratamento, de cerca de 8% (em 1 dos 13 animais da amostra). No estudo feito por Leo et al. (2014), em que utilizaram CIC numa média de 14mg/m², ocorreu trombocitopénia, de grau 1, em 4,2% dos animais (em 1 dos 24 animais da amostra). Se compararmos os resultados obtidos no nosso estudo com os obtidos por Mitchell et al. (2012) e por Leo et al. (2014), verifica-se, no presente estudo, uma menor expressão de trombocitopénia, o que poderá ser explicado pelo maior tamanho da amostra do presente trabalho.

No estudo realizado de Elmslie et al. (2008) a toxicidade GI ocorreu em 23,3% da amostra (7 em 30), sendo estes episódios classificados em grau 1 e 2. Já Leo et al. (2014) obtiveram uma toxicidade GI correspondente a 16% da amostra (4 em 24), também de grau 1 e 2 apenas. Todos estes resultados são inferiores aos obtidos no presente trabalho, no qual se verificou toxicidade GI em 44,4% dos animais (16 em 36). Uma das causas para a grande expressão da toxicidade GI na amostra deste estudo, pode estar relacionada com a utilização combinada da CIC quer com o fosfato de toceranib, quer com os AINEs. Porém, apenas 5 dos 16 animais (31%), que manifestaram esta forma de toxicidade, estavam a cumprir protocolos combinados, estando os restantes 11 (69%) a receber CIC em monoterapia. Desta forma, apesar de poder ter contribuído, não terá sido a utilização combinada de fármacos, a principal responsável pela expressividade da toxicidade GI. A explicação poderá estar no facto de a amostra deste estudo ser superior às

dos trabalhos referidos, no estado clínico dos animais, na própria evolução da doença, à realização de um seguimento mais abrangente e mais apertado no presente estudo e eventualmente à existência de alterações GI anteriores. É também necessário ter em conta o possível efeito cumulativo, devido à utilização da CIC a longo prazo nos animais em estudo, que de alguma forma pode ter afetado o sistema GI.

Ainda no que concerne à toxicidade GI é importante referir que muito provavelmente a náusea foi subvalorizada, dado que o vômito está sempre associado à ocorrência de náusea, e neste estudo verifica-se que há uma desproporção no número de episódios de vômito e de náusea observados (16 e 1 respetivamente).

No que respeita à toxicidade hepática, ocorreram 16 episódios em 10 animais (27,8%) da amostra em estudo. Neste caso houve predomínio do grau 2 (56,2%), seguido do grau 1 (25%). Existiram ainda dois episódios classificados em grau 3 (12,5%) e apenas um em grau 4 (6,3%). Em 9 dos 10 animais que desenvolveram toxicidade hepática a CIC foi administrada em monoterapia; apenas um animal fez um protocolo combinado de CIC a 15mg/m² associada a fosfato de toceranib. É assim de referir que o animal que desenvolveu toxicidade hepática grau 4, fazia o protocolo combinado de CIC com fosfato de toceranib, podendo eventualmente, esta ser uma das possíveis explicações para a gravidade deste episódio, dado que se utilizou de forma conjunta dois compostos que sofrem metabolização hepática. Apesar disto, a maioria dos animais que desenvolveram toxicidade hepática, receberam CIC na dose de 15mg/m² [8 em 10 (80%)].

De referir ainda que 2 destes 10 animais apresentavam, nas análises prévias ao início da QM, níveis de ALT acima do limite superior. No entanto, estes foram considerados nos animais que desenvolveram toxicidade hepática, uma vez que o valor da ALT teve um agravamento após a terapêutica quimioterápica, considerando-se assim que pode existir relação de causalidade com a terapêutica.

Na bibliografia referida (Lana et al., 2007, Elmslie et al., 2008, Burton et al., 2011, Marchetti et al., 2012, Mitchell et al., 2012 e Leo et al., 2014) nenhum dos autores relata a ocorrência de toxicidade hepática. Assim, a maior expressão desta toxicidade poderá dever-se sobretudo à realização de um seguimento mais abrangente e mais apertado no presente trabalho (Lana et al., 2007 e Burton et al., 2011, não realizavam nos seus seguimentos qualquer avaliação dos parâmetros bioquímicos hepáticos) mas ainda ao fato de a amostra deste estudo ser superior às dos trabalhos mencionados.

Quanto à toxicidade renal, verificaram-se 13 episódios em 8 animais, correspondente a 22,2% da amostra. Quanto à gravidade destes episódios (gráfico 17) 76,92% deles foram de grau 1 e 23,08% grau 2. O resultado obtido para a toxicidade renal (22,2%) é superior ao descrito por

Esmlie et al. (2008), que obtiveram 7% de toxicidade renal (2 em 30), grau 2, mas muito semelhante à obtida no trabalho realizado por Leo et al. (2014), no qual a toxicidade renal ocorreu em 20% dos animais (3 em 15) que realizaram um seguimento superior a 4 semanas. Também aqui se poderá pensar que, além da CIC, a principal causa para a ocorrência de toxicidade renal será o uso concomitante de AINEs ou fosfato de toceranib. No entanto, em 6 dos 8 animais com toxicidade renal, a CIC foi utilizada em monoterapia, sendo apenas utilizada associada ao fosfato de toceranib em 2 dos animais (25%). Porém, é de salientar que na maioria dos animais que, neste estudo, desenvolveu toxicidade renal (7 em 8), a CIC foi utilizada na dose de 15mg/m². Esta expressão da toxicidade renal poderá também verificar-se devido à maior dimensão da amostra do nosso estudo, mas também poderá dever-se ao estado clínico dos animais e na própria evolução da doença.

Como já foi mencionado, a CHE, pode surgir devido a uma ação lesiva na bexiga causada pela acroleína, produto resultante do metabolismo da ciclofosfamida (MacDonald & Dickinson, 2014; Rassnick et al., 2014). Neste trabalho dois animais desenvolveram CHE secundária à QM com ciclofosfamida (5,5% da amostra), sendo um destes episódios classificado em grau 2 e o outro em grau 3. A CIC foi utilizada em monoterapia em ambos os animais, na dose de 10mg/m² na cadela que desenvolveu CHE grau 3 e na dose de 15mg/m² na cadela com CHE de grau 2. A CHE nestes animais ocorreu, em média, 40 dias após o início do tratamento (intervalo de 30-50 dias). Estes valores de incidência e de aparecimento da sintomatologia são muito inferiores aqueles descritos na literatura, dado que, segundo um estudo realizado por Best & Fry (2013), a incidência de CHE após a administração de um protocolo de terapia metronómica com CIC por mais de 30 dias foi de 28,5%, em média, 216 dias após o início do tratamento (Best & Fry, 2013). No entanto, Elmslie et al. (2008), obtiveram um resultado mais próximo ao do presente estudo, uma vez que, 10% dos 30 cães que compõe a sua amostra, desenvolveram CHE (7% grau 2 e 3% grau 4).

No trabalho de Best & Fry (2013) não foram utilizados compostos “quimioprotetores”, como a furosemida, sendo este facto uma das justificações que os autores apresentam para a elevada incidência de CHE. No presente estudo, também não se administrou furosemida a nenhum dos 36 animais que constituem a amostra, tendo-se, apesar disso, verificado uma baixa incidência de CHE secundária à QM (5,5% da amostra).

Quanto à duração da sintomatologia, está descrito que este poderá variar entre 21 e 136 dias (média de 60,5 dias) de acordo com um único estudo (Charney et al., 2003). Neste trabalho verificou-se que a sintomatologia se manteve, em média, durante 65 dias (intervalo de 46-90 dias).

Nos casos menos graves de CHE está preconizada a realização de fluidoterapia, indução da diurese forçada com furosemida (2mg/kg PO BID), utilização de anti-inflamatórios e prevenção da infecção com antibioterapia. No entanto, relativamente à abordagem a adotar nos casos de animais com CHE graves, como o caso da cadela com CHE grau 3, na ausência de literatura científica, optou-se por adaptar, para este caso, o protocolo que está descrito em medicina humana, utilizando-se instilação vesical de DMSO (Tomoe, 2015). Desta forma, a concentração de DMSO utilizada foi diminuída de 50% para 30% e a permanência do composto no interior da bexiga não excedeu os 10 minutos. É importante não esquecer que apesar de o DMSO ser o principal composto utilizado para instilação intravesical (devido aos seus efeitos analgésicos, colagenolíticos e de relaxamento muscular), este também tem um potencial tóxico, não sendo portanto, isento de risco (Tomoe, 2015). Nesta cadela de forma a prevenir a dor e a inflamação que o composto tende a causar, recorreu-se ao uso de um corticóide e de um opióide sistémicos. Com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento quimioterápico, devido ao efeito sinérgico que alguns fármacos apresentam, utilizam-se protocolos quimioterápicos multi-fármacos. Uma das grandes desvantagens destes protocolos é a maior possibilidade de ocorrência de efeitos secundários (Lana & Dobson, 2010).

No presente estudo foi avaliada a relação entre a ocorrência de efeitos secundários da QM e o tipo de protocolo utilizado – protocolo de fármaco único (CIC a 10 ou 15mg/m²) ou protocolo combinado (CIC a 10 ou 15mg/m² associada a AINE's ou a fosfato de toceranib), tendo-se verificado que existe associação entre a ocorrência de efeitos secundários e o tipo de protocolo utilizado. No entanto, não sendo uma amostra uniforme, nomeadamente no que diz respeito ao tipo de neoplasia presente e ao tempo de duração da terapêutica, já que a duração do tratamento com CIC em monoterapia foi, em média, de 102 dias e a duração do tratamento com CIC em terapia combinada foi, em média, 84 dias. Desta forma, estes fatos poderão ter influenciado os resultados obtidos e por isso deverá ter-se cuidado na sua análise.

Devido ao facto de 16 dos animais deste estudo terem sido submetidos a tratamento com compostos anti-neoplásicos, utilizando a DMT, previamente ao início do tratamento com QM (4 destes animais realizavam protocolo C-S), procedeu-se também à avaliação de uma possível relação entre a ocorrência de efeitos secundários e a realização prévia desta terapêutica com DMT. Considerou-se importante avaliar esta relação uma vez que estes animais poderiam ser mais suscetíveis ao desenvolvimento de efeitos secundários, já que o “onset” para o seu desenvolvimento poderia estar alterado. Porém, não foi identificada relação entre estas duas variáveis. Este resultado pode ser explicado pelo facto de todos os animais que realizaram DMT anteriormente à QM, terem realizado um intervalo superior a pelo menos uma semana entre os

dois tratamentos, dando por isso tempo suficiente para a recuperação dos tecidos, até se iniciar o protocolo de QM.

Procedeu-se ainda à avaliação de uma possível associação entre a ocorrência de efeitos secundários e a dose de CIC quando utilizada em monoterapia - 10 ou 15 mg/m² - não se verificando também a existência de evidência estatística de associação entre as variáveis referidas.

É ainda necessário ter em conta que o estudo é retrospectivo e como a identificação da maioria dos efeitos secundários foi efetuada a partir das fichas clínicas do animal, esta está dependente do tipo de anotações realizadas pelo clínico, bem como do tipo de informação transmitida pelo proprietário do animal ao próprio clínico. Desta forma, os dados obtidos poderão não ser totalmente objetivos, serem passíveis de diferentes interpretações ou estarem muitas vezes incompletos. O ideal, nestes casos, para se realizar uma avaliação mais rigorosa de todos os episódios observados, seria desenvolver um questionário com perguntas fechadas ou um caderno diário de anotações para os donos, de preenchimento simples. Assim, durante o tratamento quimioterápico os proprietários poderiam descrever cada episódio manifestado pelo seu animal, permitindo assim ao clínico completar, de forma mais precisa, a ficha clínica do animal, como já foi sugerido noutro estudo (Cunha, 2014).

9. Conclusão

Este estudo apresenta limitações pelo seu carácter retrospectivo, amostra reduzida, diferentes neoplasias e utilização de diferentes protocolos de QM. Ainda assim, pode-se concluir que a QM com CIC não é isenta de toxicidade, uma vez que cerca de 72% dos animais da amostra apresentaram pelo menos um efeito secundário. No entanto, estes foram na sua maioria classificados em grau 1 e 2 de toxicidade, o que sugere que a CIC a 10 ou 15mg/m², em monoterapia ou em terapia combinada com AINEs ou fosfato de toceranib, parece ser uma opção bem tolerada por cães e gatos com neoplasias malignas. É assim importante a realização de mais estudos prospetivos com a utilização de protocolos de QM com CIC, que corroborem estes resultados.

Salienta-se que apesar da amostra deste estudo ser reduzida, é superior à da literatura publicada e ainda que se pretende, num futuro próximo, dar continuidade a esta linha de investigação.

Como se pode observar, a toxicidade hematopoiética e gastrointestinal são os efeitos mais frequentes. Posto isto, devemos ter em conta que, sobretudo os valores do hematócrito e da contagem de eritrócitos deverão ser avaliados, de forma crítica, antes de qualquer tratamento de QM. Isto porque, muitas vezes o aparecimento de anemia, durante o tratamento, não significa que esta seja induzida pela quimioterapia, tal como referido noutro trabalho (Cunha, 2014). O mesmo se aplica aos parâmetros bioquímicos indicativos de insuficiência hepática e renal, sendo assim, de extrema importância avaliar o estado clínico do animal, antes do tratamento, para identificar possíveis alterações que não sejam, posteriormente, relacionadas com a terapia aplicada. A neutropénia e trombocitopénia podem também ocorrer, tendo sido identificadas neste estudo em 5,5% e 2,8% dos animais, respetivamente.

Apesar de não se ter verificado neste trabalho efeitos adversos associados à utilização de AINEs e fosfato de toceranib, aconselha-se, mesmo assim, que aquando da sua utilização em protocolos de QM se controlem periodicamente os efeitos que podem ocorrer devido à sua utilização com análises periódicas (medição dos valores de creatinina plasmática e ALT, pelo menos).

Neste estudo também se verificou que na maioria dos animais que desenvolveu efeitos secundários a CIC foi administrada a 15mg/m². No entanto, esta também foi a dose mais representada nos protocolos utilizados no presente trabalho, podendo ser essa a razão para este resultado. Apesar disso, este achado vem reforçar a necessidade de se avaliar e de se determinar, de forma sistemática, qual a dose biológica ótima da QM, quer em monoterapia, quer em combinação com outros compostos.

Por sua vez, a seleção de uma amostra mais uniforme (sobretudo no que diz respeito ao protocolo utilizado, à duração do tratamento e ao estadió da doença) e com maior número de

doentes, permitiria uma avaliação mais consistente e direcionada de todos os aspetos avaliados. A avaliação da relação entre a ocorrência de efeitos secundários e o protocolo utilizado foi difícil de realizar também devido à ausência de uniformidade dos protocolos e à reduzida dimensão da amostra. Idealmente, deveria proceder-se à seleção de um único protocolo, com uma duração exata de tratamento, facilitando deste modo todo o estudo.

No entanto, apesar das limitações e de algumas dificuldades apresentadas, pensamos que foi possível cumprir o objetivo do estudo - obter um melhor conhecimento da realidade clínica dos efeitos adversos em animais de companhia, com neoplasias malignas, submetidos a QM com ciclofosfamida.

Em conclusão, é possível dizer que é evidente a necessidade de estudos prospetivos em que se utilizem protocolos otimizados de QM, de maneira a se poder avaliar de forma consistente a sua toxicidade sistémica mas também quais as neoplasias mais sensíveis a esta terapêutica e ainda para permitir a otimização das doses utilizadas e dos protocolos de administração. É também necessário definir o papel dos protocolos de QM como tratamento de primeira linha, como terapia combinada ou como tratamento paliativo.

Embora a QM seja uma opção de tratamento atraente, que já é bastante utilizada em medicina veterinária, esta é considerada ainda como uma abordagem experimental, uma vez que a seleção das doses ainda é realizada de forma empírica, apresentando desta forma um risco de ocorrência de efeitos tóxicos. Assim sendo, é importante que aquando da sua utilização se tenha previamente em conta a condição geral do doente e ainda, como acontece em qualquer plano de tratamento quimioterápico, se faça um acompanhamento adequado da potencial toxicidade como uma parte da rotina de assistência ao doente.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmadi, A., Ebrahimzadeh, M. A., Ahmad-Ashrafi, S., Karami, M., Mahdavi, M. R. & Saravi, S. S. S. (2011). Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H₂ receptor antagonists. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 25 (1), 72–79. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-8206.2009.00810.x/epdf>
- Akay, H., Akay, T., Secilmis, S., Kocak, Z. & Donderici, O. (2006). Hepatotoxicity after low-dose cyclophosphamide therapy. *Southern Medical Journal* 99, 1399–1400.
- André, N., Carré, M. & Pasquier, E. (2014). Metronomics: towards personalized chemotherapy? *Nature reviews Clinical Oncology*, 11(7), 413–431. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v11/n7/full/nrclinonc.2014.89.html>
- Argyle, D.J., Brearley, M.J., Turek, M.M. & Roberts, L. (2008). Cancer treatment modalities. In D.J. Argyle, M.J. Brearley, M.M Turek (Eds.), *Decisions making in small animal oncology*. (pp. 93-119) Iowa: Wiley-Blackwell.
- Balducii, L. (2007). Aging, frailty, and chemotherapy. *Cancer control*, 14(1), 7-12. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <https://www.moffitt.org/File%20Library/Main%20Nav/Research%20and%20Clinical%20Trials/Cancer%20Control%20Journal/v14n1/7.pdf>
- Barros, V. & Repetti, S.F. (2015). Metronomic chemotherapy in dogs: a review. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 110, 49-53. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf6_2015/49-53.pdf
- Bellmunt, J., Trigo, J.M., Calvo, E., Carles, J., Pérez-gracia, J.L., Rubió, J., Virizuela, J.A., López, R. & Campal, O.C. (2010). Activity of a multitargeted chemo-switch regimen (sorafenib, gemcitabine, and metronomic capecitabine) in metastatic renal-cell carcinoma: a phase 2 study (SOGUG-02-06). *The Lancet Oncology*, 11(4), 350–357. Acedido em Mar. 12, 2016, disponível em: [http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(09\)70383-3/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(09)70383-3/abstract)
- Bergers, G. & Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401-410. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n6/full/nrc1093.html>
- Bertolini, F., Paul, S., Mancuso, P., Monestiroli, S., Gobbi, A., Shaked, Y. & Kerbel, R.S. (2003). Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Research*, 63, 4342–4346. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/15/4342.long>

- Best, M.P. & Fry, D.R. (2013). Incidence of sterile hemorrhagic cystitis in dogs receiving cyclophosphamide orally for three days without concurrent furosemide as part of a chemotherapeutic treatment for lymphoma: 57 cases (2007-2012). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 243 (7), 1025-1029. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/full/10.2460/javma.243.7.1025>
- Biller, B. (2014). Metronomic Chemotherapy in Veterinary Patients with Cancer Chemotherapy. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 44(5), 817-829. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561614000813>
- Blackwood, L. (2010). Tumours of the skin and subcutaneous tissues. In J.M. Dobson & B.D.X. Lascelles (Eds), *BSAVA manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp. 13-158). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J. & Kessler, M. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10 (3), 1-29.
- Brønden, L.B., Rutteman, G.R., Flagstad, A. & Teske, E. (2003). Study of dog and cat owners' perceptions of medical treatment for cancer. *The Veterinary Record*, 152(3), 77-80. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/322908>
- Browder, T., Butterfield, C.E. & Kräling, B.M. (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Research*, 60, 1878-1886. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/7/1878.long>
- Bryan, T.M. & Cech, T.R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current opinion in cell biology*, 11(3), 318-324. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506749980043X>
- Burton, J.H., Mitchell, L., Thamm, D.H., Dow, S.W. & Biller, B.J. (2011). Low-Dose Cyclophosphamide Selectively Decreases Regulatory T Cells and Inhibits Angiogenesis in Dogs with Soft Tissue Sarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 920-926. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.0753.x/epdf>
- Callegari-Jacques, S. M. (2003). Testes de hipóteses. In S.M. Callegari-Jacques (ed.), *Bioestatística princípios e aplicação*. (pp.54-62). Porto Alegre: ARTMED Editora.
- Charney, S.C., Bergman, P.J., Hohenhaus, A.E. & McKnight, J.A. (2003). Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222 (10), 1388-1393.
- Cleland, B.D. & Pokorny, C.S. (1993). Cyclophosphamide related hepatotoxicity. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 23(4), 408.

- Chon, E., McCartan, L., Kubicek, L.N. & Vail, D.M. (2012). Safety evaluation of combination toceranib phosphate (Palladia[®]) and piroxicam in tumor-bearing dogs (excluding mast cell tumors): a phase I dose-finding study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), 184-193. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2011.00265.x/pdf>
- Chun, R. Garret, L.D. & Vail, D.M. (2007). Cancer chemotherapy. In S.J. Withrow & D.M. Vail (Eds.) *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. (4th ed.) (pp.163-188). Missouri: Saunders.
- Collins, F.S. (2010). *The language of life: DNA and the revolution in personalized medicine*. New York: HarperCollins Publishers.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/30/7/1073.long>
- Conway, E. M., Collen, D., & Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*, 49(3), 507–521. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: https://www.researchgate.net/publication/12164326_Conway_EM_Collen_D_CarmelietPMolecular_mechanisms_of_blood_vessel_growth_Cardiovasc_Res_49_507-521
- Coppoc, G.L. (2009). Chemotherapy of neoplastic diseases. In J.E Riviere & M.G. Papich (Eds.), *Veterinary pharmacology and therapeutics*. (9th ed.)(pp.1205- 1231). Iowa State University Press: Wiley- Blackwell.
- Couto, C. G. (2008). Oncology. In R.W. Nelson & C. G. Couto (Eds.), *Small animal internal medicine*. (4 ed.)(pp. 1143-1195). Missouri: Mosby Elsevier.
- Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature*, 441(7092), 444-50. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v441/n7092/full/nature04872.html>
- Crump, K.T. (2013). Cancer and chemotherapy. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: http://www.vspn.org/Library/Misc/VSPN_M02045.htm
- Crow, S.E., Theilen, G.H., Madewell, B.R., Weller, R.E. & Henness, A.M. (1977). Cyclophosphamide-induce cystitis in the dog and cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171, 259-262.
- Cunha, E. (2014). *Avaliação dos efeitos secundários dos fármacos quimioterápicos em Animais de companhia- estudo retrospectivo*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A. & Bouck N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265(5178), 1582-1584. Acedido em Nov. 25, 2015, disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/265/5178/1582.long>

- Danova, M., Barni, S., Mastro, L.D., Danesi, R. & Pappagallo, G. L. (2011). Optimal use of recombinant granulocyte colony-stimulating factor with chemotherapy for solid tumors. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(8), 1303–1313. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/era.11.72?journalCode=iery20#.V2AYRvkrLIU>
- Diaz-Montero, C. M., Wang, Y., Shao, L., Feng, W., del-Aziz Zidan, A., Pazoles, C. J., Montero, A. J. & Zhou, D. (2012). The glutathione disulfide mimetic, NOV-002, inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9): 1560–1568. Acedido em Mar. 12, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341494/>
- Distler, J., & Hirth, A. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The quarterly journal of nuclear medicine*, 47(3), 149–161. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://www.minervamedica.it/en/freedownload.php?cod=R39Y2003N03A0149>
- Dobson, J.M. (2010). Clinical staging and the TNM classification. In J.M. Dobson & B.D.X. Lascelles (Eds), *BSAVA manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp. 20-29). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Dobson, J.A., Hohenhaus, A.E. & Peaston, A.E. (2008). Cancer chemotherapy. In J. Maddison (Ed.), *Small Animal Clinical Pharmacology*. (2nd. ed.). London: Saunders
- Elmslie, R.E., Glawe, P. & Dow, S.W. (2008). Metronomic Therapy with Cyclophosphamide and Piroxicam Effectively Delays Tumor Recurrence in Dogs with Incompletely Resected Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 1373-1379. Acedido em Nov. 8, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2008.0179.x/abstract>
- Eskens, F.A. (2004). Angiogenesis Inhibitors in clinical development: where are now and where are we going? *British Journal of Cancer*, 90, 1-7. Acedido em Jan. 13, 201, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395335/>
- Fan, T.M., Kitchell, B.E., Dhaliwal, R.S., Jones, P.D., Hintermeister, J.G. & Paria, B.C. (2002). Hematological toxicity and therapeutic efficacy of lomustine in 20 tumor-bearing cats: critical assessment of a practical dosing regimen. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(4), 357-63. Acedido em Jan. 13, 201, disponível em: <http://jaaha.org/doi/pdf/10.5326/0380357>
- Farber, S., Diamond, L.K., Mercer, R.D., Sylvester R.F., & James, A.W. (1948). Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist 4-Aminopteroylglutamic Acid (Aminopterin). *New England Journal of Medicine*, 238, 2010–2013. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM194806032382301#t=article>

- Finn, O.J. (2012). Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*, 23, 8–11. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: http://annonc.oxfordjournals.org/content/23/suppl_8/viii6.full.pdf+html
- Fleitas, T., Martinez-Sales, V., Vila, V., Reganon, E., Mesado, D., Martin, M., Gómez-Codina, J., Montalar, J. & Reynés, G. (2013). VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 15 (11), 897–902. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12094-013-1020-6>
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285(21), 1182–1186. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM197111182852108>
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* 29(6, Suppl 16), 15–18.
- Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Experimental Cell Research*, 312, 594–607. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.462.7985&rep=rep1&type=pdf>
- Frimberger, A.E. (2010). Principles of chemotherapy. In S.J. Ettinger & E.C Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. (7th ed.). (pp.2121-2126). Missouri: Sauders Elsevier.
- Gaeta R, Brown D, Cohen R & Sorenmo, K. (2012). Risk factors for development of sterile haemorrhagic cystitis in canine lymphoma patients receiving oral cyclophosphamide: a case-control study. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(4), 277-286.
- Gallimore, A. & Simon, A. (2008). Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene*, 27, 5886–5893. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/v27/n45/full/onc2008269a.html>
- Garrett, M.D. (2001). Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81, 515-522. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.iisc.ernet.in/~currsci/sep102001/515.pdf>
- Garrett, L.D., Thamm, D.H., Chun, R., Dudley, R. & Vail, D.M. (2002). Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 704–709. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02411.x/epdf>
- Gasparini, G. (2001). Metronomic Sheduling: the future of chemotherapy. *The Lancet Oncology*, 2, 733-740. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: [http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(01\)00587-3/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(01)00587-3/abstract)
- Gately, S., Twardowski, P., Stack, M.S., Cundiff, D.L., Grella, D., Castellino, F.J., Enghild, J., Kwaan, J., Lee, F., Kramer, R.A., Volpert, O., Bouck, N., & Soff, G.A. (1997). The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 10868–10872.

Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em:
<http://www.pnas.org/content/94/20/10868.full.pdf>

- Grant, D.S., Williams, T.L., Zahaczewsky, M. & Dicker, A.P. (2003). Comparision of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Internacional Journal of Cancer*, 104, 121-29. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.10907/abstract;jsessionid=1E6667338DEC8B0477D0B14786049B28.f04t03>
- Ghosh, S., Ghosh, D., Chattopadhyay, S. & Debnath, J. (1999). Effect of ascorbic acid supplementation on liver and kidney toxicity in cyclophosphamide-treated female albino rats. *Journal of Toxicological Sciences*, 24, 141– 144.
- Gu, X., Xu, Z.Y., Zhu, L.Y., Wang, L.F., Li, K. & Pei, Q. (2013). Dual control of Shuanghuang Shengbai granule on upstream and downstream signal modulators of CyclinD-CDK4/6 signaling pathway of cell cycle in Lewis-bearing mice with cyclophosphamide-induced myelosuppression. *Oncotargets and therapy*, 6, 199-209. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3615883/>
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3), 353–364. Acedido em Jan. 8, 2016, disponível em: [http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(00\)80108-7?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400801087%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(00)80108-7?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400801087%3Fshowall%3Dtrue)
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0092867400816839/1-s2.0-S0092867400816839-main.pdf?_tid=b9936ce0-316a-11e6-86e0-00000aacb35d&acdnat=1465824693_098b7919c34442c08280a77dbdf2c041
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: [http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(11\)00127-9?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411001279%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(11)00127-9?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411001279%3Fshowall%3Dtrue)
- Harris, C.C. (1996). p53 tumor suppressor gene - from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17(6), 1187-1198. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/17/6/1187.long>
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*, 62(11), 1180-1190.
- Heading, K.L., Brockley, L.K. & Bennett, P.F. (2011). CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002-07). *Australian Veterinary Journal*, 89(4), 109-116. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2011.00690.x/epdf>
- Hosoya, K., Lord, L.K., Lara-Garcia, A., Kisseberth, W.C., Londo, C.A. & Couto, C.G. (2009). Prevalence of elevated alanine transaminase activity in dogs treated with CCNU (lomustine). *Veterinary and Comparative Oncology*, 7, 244–255. Acedido em Jan. 13,

2016, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2009.00197.x/epdf>

- Huitema, A.D.R., Tibben, M.M., Kerbusch, T., Rodenhuis, S., Kettenes-van den Bosch, J.J. & Beijnen, J.H. (2000). High performance liquid chromatographic determination of the stabilized cyclophosphamide metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in plasma and red blood cells. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 23, 1725–1744. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: https://www.researchgate.net/publication/288686934_Enantioselective_analysis_of_4-hydroxycyclophosphamide_in_human_plasma_with_application_to_a_clinical_pharmacokinetic_study
- Jonge, M.E., Huitema, A.D., Beijnen, J.H. & Rodenhuis, S. (2006). High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 94, 1226–1230. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.nature.com/bjc/journal/v94/n9/full/6603097a.html>
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.F. & Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology*, 30, 531–564. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Kerbel, R.S. (1991). Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioassays*, 13, 31–36. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.950130106/epdf>
- Kerbel, R.S. (2007). Improving Conventional or low dose metronomic chemotherapy with targeted antiangiogenic drugs. *Cancer Research Treatment*, 39, 150-159. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2739367/>
- Kerbel, R.S. & Kamen, B.A. (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature review cancer*, 4, 423-436. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/480745>
- Kern, J.C. & Kehrer, J.P. (2002) Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chemico-Biological Interactions*, 139, 79–95. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279701002952>
- Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., Man, S., Clark, K., Hicklin, D.J., Bohlen, P. & Kerbel R.S. (2000). Continuous low-dose therapy with vinblastine and vegf receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 15–24. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC517491/>
- Koumariou, A., Christodoulou, M.I., Patapis, P., Papadopoulos, I., Liakata, E., Giagini, A., Stavropoulou, A., Poulakaki, N., Tountas, N., Xiros, N., Economopoulos, T., Pectasides, D., Tsitsilonis, O.E. & Pappa, V. (2014). The effect of metronomic versus standard chemotherapy on the regulatory to effector T-cell equilibrium in cancer patients. *Experimental Hematology & Oncology*, 3, 3. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906764/>

- Kristal, O., Rassnick, K.M., Gliatto, J.M., Northrup, N.C., Chretien, J.D., Morrison-Collister, K., Cotter, S.M. & Moore, A.S. (2004). Hepatotoxicity associated with CCNU (lomustine) chemotherapy in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18, 75–80. Acedido em Mar. 12, 2016, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2004.tb00138.x/epdf>
- Lana, S., U'ren, L., Plaza, S., Elmslie, R., Gustafson, D., Morley, P. & Dow, S. (2007). Continuous Low-Dose Oral Chemotherapy for Adjuvant Therapy of Splenic Hemangiosarcoma in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 764-769. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03019.x/epdf>
- Lana, S.E. & Dobson, J.M.(2010). Principles of chemotherapy, in Dobson, J.M & Lascelles, B.D.X.(Eds) *BSAVA manual of canine and feline oncology* .(3rd ed.). (pp. 60-79). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Leach, T.N., Childress, M.O., Greene, S.N., Mohamed, A.S., Moore, G.E., Schrempp, D.R., Lahrman, S.R. & Knapp, D.W. (2012). Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer. *Veterinary Comparative Oncology* 10(2), 102-112. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2011.00280.x/abstract>
- Leo, C, Stell, A., Borrego, J., Martinez de Merlo, E., Ruess-Melzer, K. & Lara-Garcia, A. (2014). Evaluation of low-dose metronomic (LDM) cyclophosphamide toxicity in cats with malignant neoplasia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(8), 671-678. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://jfm.sagepub.com/content/16/8/671.long>
- Levine, L.A. & Richie, J.P. (1989). Urological complications of cyclophosphamide. *The Journal of Urology*, 141(5), 1063–1069.
- Liao, A., Chien, M., Shenoy, N., Mendel, D., McMahon, G., Cherrington, J. & London, C. (2002). Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 100, 585-593.
- Lien K, Georgsdottir S, Sivanathan L, Chan, K. & Emmenegger, U. (2013). Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis. *European Journal of Cancer*, 49(16), 3387–3395. Acedido em Nov. 7, 2015, disponível em: [http://www.ejancer.com/article/S0959-8049\(13\)00541-8/abstract](http://www.ejancer.com/article/S0959-8049(13)00541-8/abstract)
- Lloret, A. (2008). The use of COX-2 drugs in oncology: clinical cases. *Proceeding of the SEVC-Southern European Veterinary Conference*. Barcelona, Spain, S/N
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
- Loktionov, A. (2004) Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Letter*, 208 (1), 1-33. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: [http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835\(04\)00145-4/abstract](http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835(04)00145-4/abstract)

- London, C. (2009). Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Topics in companion animal medicine*, 24, 106-112.
- London, C.A., Malpas, P.B., Wood-Follis, S.L., Boucher, J.F., Rusk, A.W., Rosenberg, M.P., Henry, C.J., Mitchener, K.L., Klein, M.K., Hintermeister, J.G., Bergman, P.J., Couto, G.C., Mauldin, G.N. & Michels, G.M. (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research*, 15(11), 3856–3865. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/11/3856.long>
- London, C.A., Hannah, A.L., Zadovoskaya, R., Chien, M.B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., Downing, S., Post, G., Boucher, J., Shenoy, N., Mendel, D.B., McMahon, G. & Cherrington, J.M. (2003). Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clinical Cancer Research*, 9, 2755–2768. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/7/2755.long>
- London, C.A., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M.K., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D.M., Hershey, B., Ettinger, S., Vaughan, A., Alvarez, F., Hillman, L., Kiselow, M., Thamm, D., Higginbotham, M.L., Gauthier, M., Krick, E., Phillips, B., Ladue, T., Jones, P., Bryan, J., Gill, V., Novasad, A., Fulton, L., Carreras, J., McNeill, C., Henry, C., Gillings, S. (2012). Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 10(3), 194-205. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732378/>
- Lorimier, LP & Fan, T.M. (2010). Assessment and management of pain in cancer patient. In: J.H. Carolyn & M.L. Higginbotham (Eds), *Cancer management in small animal practice*. (1a ed.). (pp- 177-79). St Louis: Saunders Elsevier.
- Loven, D., Hasnis, E., Bertolini, F. & Shaked, Y. (2013). Low-dose metronomic chemotherapy: From past experience to new paradigms in the treatment of cancer. *Drug Discovery Today*, 18, 193–201.
- Macdonald, V. & Dickinson, R. (2014). Hemorrhagic Cystitis in a dog receiving carboplatin. *Journal of the American Hospital Association*, 50 (1), 67-70.
- Malik, P.S., Raina, V. & André, N. (2014). Metronomics as maintenance treatment in oncology: time for chemo-switch. *Frontiers in Oncology*, 4, 1–7. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3989712/7>
- Manda, K., Bhatia, A.L. (2003). Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell biology and toxicology*, 19(6), 367-372.
- Marconato, L., Bettini, G., Giacoboni, C., Romanelli, G., Cesari, A., Zatelli, A. & Zini, E. (2008). Clinicopathological Features and Outcome for Dogs with Mast Cell Tumors and Bone Marrow Involvement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 1001-1007.
- Marconato, L. (2009). *Principi di Chemioterapia in Oncologia* (5th ed.). Milano: Polletto Editore s.r.l.

- Marconato, L., Ruess-Melzer, K., Buchholz, J. & Kaser-Hotz, B. (2011). New concepts in human oncology: is it possible to use them in veterinary medicine as well? *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 153(8), 351–360.
- Marchetti, V., Giorgi, M., Fioravanti, A., Finotello, R., Citi, S., Canu, B., Orlandi, P., Di Desidero, T., Danesi, R., Bocci, G. (2012). First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. *Investigational New Drugs*, 30(4), 1725-730. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10637-011-9672-y>
- Maroco, J. (2003). Inferência estatística. In J. Maroco (ed.), *Analise estatística com utilização do spss*. (pp. 56-60). Lisboa: Edições Silabo.
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, B.M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J. & Seibert, K. (2000). Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Cancer Research*, 60 (5), 1306–1311. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/5/1306.long>
- Matos, P., & Pereira, M. (2005). Áreas de intervenção na doença oncológica. In M. Pereira, & C. Lopes (Eds.). *O doente oncológico e a sua família* (pp. 15-25). Lisboa: Climepsi Editores.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E. Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. & Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271–275.
- McCleese, J.K. & Bear, M.D. (2009). The novel HSP90 inhibitor STA-1474 exhibits biologic activity against osteosarcoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 125 (12), 2792-2801. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.24660/pdf>
- McDonald, G.B., Slattery, J.T., Bouvier, M.E., Batchelder, A.L., Kalhorn, T.F., Schoch, H.G., Anasetti, C. & Gooley, T. (2003). Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 101, 2043–2048. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: <http://www.bloodjournal.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=12406916>
- Mellanby, R. (2010). Paraneoplastic syndromes. In J.M. Dobson & B.D.X. Lascelles (Eds), *BSAVA manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp. 30-39). Gloucester: BSAVA.
- Merdad, A, Karim, S., Schulten, H.J., Dallol, A., Buhmeida, A., Al-Thubaity, F., Gari, M.A., Chaudhary, A.G., Abuzenadah, A.M. & Al-Qahtani, M.H. (2014). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Research*, 34(3), 1355-1366. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: <http://ar.iiarjournals.org/content/34/3/1355.long>
- Mitchell, E.P. & Schein, P.S. (1986). Contributions of nitrosoureas to cancer treatment. *Cancer Treatment Reports*, 70 (1), 31–41.

- Mitchell, L., Thamm, D.H. & Biller, B.J. (2012). Clinical and Immunomodulatory Effects of Toleranib Combined with Low-Dose Cyclophosphamide in Dogs with Cancer. *Journal of Veterinary and Internal Medicine*, 26, 355-362. Acedido em Nov. 9, 2015, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.00883.x/epdf>
- Moore, A.S. (2010). Practical chemotherapy. In S.J. Ettinger & E.C Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine*. (7th ed.). (pp.2121-2126). Missouri: Sauders Elsevier.
- Motawi, T.M.K., Sadik, N.A.H. & Refaat, A. (2010) Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food Chemical Toxicology*, 48, 2326–2336. Acedido em Jan. 20, 2016, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510003601>
- Mross, K. & Steinbild, S. (2012). Metronomic anti-cancer therapy – an ongoing treatment option for advanced cancer patients. *Journal of Cancer Therapeutics and Research*, 5(3): 186–192. Acedido em Jan. 20, 2016, disponível em: <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2049-7962-1-32.pdf>
- Muratori, L., Ferrari, R., Muratori, P., Granito, A. & Bianchi, F.B. (2005): Acute icteric hepatitis induced by a short course of low-dose cyclophosphamide in a patient with lupus nephritis. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(12), 2364–2365. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10620-005-3065-z>
- Musser, M.L., Quinn, H.T. & Chretien, J.D. (2012). Low apparent risk of CCNU (lomustine)-associated clinical hepatotoxicity in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14, 871-875. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: <http://jfm.sagepub.com/content/14/12/871.long>
- Mutsaers, A.J., Widmer, W.R. & Knapp, D.W. (2003). Canine transitional cell carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 136–144.
- Mutsaers, A.J. (2007). Chemotherapy: New uses for old drugs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37, 1079-1090.
- Mutsaers, A.J. (2009). Metronomic Chemotherapy. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24 (3), 137-143.
- North, S. & Banks, T. (2009). Mast Cell Tumour. In S. North & T. Banks, *Introduction to Small Animal Oncology*, (1ª Ed., pp. 183-196). Saunders-Elsevier.
- Ozao-Choy, J., Ma, G., Kao, J., Wang, G.X., Meseck, M., Sung, M., Schwartz, M., Divino, C.M., Pan, P.Y. & Chen, S.H. (2009). The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Research*, 69 (6), 2514–2522. Acedido em Jan. 20, 2016, disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/6/2514.long>
- Paoloni, M.C. & Khanna, C. (2007). Comparative Oncology Today. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(6), 1–10. Acedido em Jan. 20, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2174910/pdf/nihms34450.pdf>

- Pasquier, E., Kavallaris, M. & André, N. (2010). Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nature Review of Clinical Oncology*, 7 (8), 455-465. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v7/n8/full/nrclinonc.2010.82.html>
- Penel, N., Adenis, A. & Bocci, G. (2012). Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: After 10 years of experience, where do we stand and where are we going? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 82(1), 40-50. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: [http://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(11\)00118-1/pdf](http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(11)00118-1/pdf)
- Peterson, J.L., Couto, C.G., Hammer, A.S. & Ayil, R.D. (1992). Acute sterile hemorrhagic cystitis after a single intravenous administration of cyclophosphamide in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201 (10), 1572– 1574. Acedido em Jan. 20, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1289337>
- Pierini, A., Bocci, G., Giorgi, M., Owen, H. & Marchetti, V. (2012). From Humans to Dogs and Back: The Translational Lesson of Metronomic Chemotherapy. *American Journal of Veterinary Sciences*, 7 (4), 198–212. Acedido em Fev. 9, 2016, disponível em: <http://thescpub.com/PDF/ajavsp.2012.198.212.pdf>
- Pietras, K. & Hanahan, D. (2005). A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose “chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(5), 939-952. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: <http://jco.ascopubs.org/content/23/5/939.long>
- Pires, I., Garcia, A., Prada, J. & Queiroga, F.L. (2010). COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumors. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 142-149. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997510000241>
- Plumb, D.C. (Ed). (2008). *Plumbs veterinary drug handbook*. (6th ed.). Iowa: Blackwell Publishing.
- Polyak, K. & Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11), a003244. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2964182/>
- Polton, G. (2014). Novel drug approaches in veterinary cancer therapy. *Veterinary Ireland Journal*, 4(1), 27-32. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: http://www.veterinaryirelandjournal.com/files/sa_jan_2014.pdf
- Prada, J., Queiroga, F.L., Gregório, H. & Pires I. (2012). Evaluation of cyclooxygenase-2 expression in canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 147(1), 31-36. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997511001575>

- Queiroga, FL. (2005). *Tumores Mamários da Cadela - Estudo de Factores Biológicos (Ciclooxygenases 1 e 2; Prolactina; Hormona do Crescimento; Factor I de Crescimento Tipo Insulina) e da sua Implicação Clínica e Prognóstica*. Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D. & Kerbel, R.S. (1995). Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Reviews*, 14(4), 263–277. Acedido em Jan. 20, 2016, disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00690598>
- Rassnick, K. M., Bailey, D. B., Malone, E. K., Flory, A. B., Kiselow, M. A., & Intile, J. L. (2014). Tolerability of lomustine in combination with cyclophosphamide in dogs with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 50(3), 167-173. Acedido em Jan. 20, 2016, disponível em: <http://jaaha.org/doi/pdf/10.5326/JAAHA-MS-6020>
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414 (6859), 105–111.
- Ribatti, D. (2012). Cancer stem cells and tumor angiogenesis. *Cancer Letters Journal*, 321, 13–17. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: https://www.researchgate.net/publication/221886215_Cancer_stem_cells_and_tumor_angiogenesis
- Richardson, G. & Dobish, R. (2007). Chemotherapy induced diarrhea. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 13(4), 181-198. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: <http://opp.sagepub.com/content/13/4/181.abstract>
- Romiti, A., Cox, M.C., Sarcina, I., Di Rocco, R., D'Antonio, C., Barucca, V. & Marchetti P. (2013). Metronomic chemotherapy for cancer treatment: A decade of clinical studies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72, 13–33.
- Rodigheri, S.M. & de Nardi, A.B. (2013). Quimioterapia metronômica em cães e gatos - revisão de literatura. *Clinica Veterinaria*, 105, 40-48.
- Scadden, D.T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441 (7097), 1075–1079.
- Scharovsky, O.G., Mainetti, L.E. & Rozados, V.R. (2009). Metronomic Chomotherapy: changing the paradigm that more is better. *Current Oncology*, 16 (2): 7-15. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2669231/>
- Schmidt, A., Böleek, B., Jedig, M., Seinritz, D., Balszuweit, F., Kehe, K. & Bloch, W. (2009). Nitrogen mustard (chlorambucil) has a negative influence on early vascular development. *Toxicology*, 263, 32–40.

- Schrempp, D. R., Childress, M.O., Stewart, J.C., Leach, T.N., Tan, K.M., Abbo, A.H., de Gortari, A.E., Nonney, P.L., & Knapp, D.W. (2013). Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242 (11), 1534-8. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.242.11.1534?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%3dpubmed
- Shaked, Y., Emmenegger, U., Francia, G., Chen, L., Lee, C.R., Man, S., Paraghamian, A., Ben-David, Y. & Kerbel, R.S. (2005). Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy. *Cancer Research*, 65, 7045–7051. Acedido em Nov. 15, 2015, disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/16/7045.long>
- Shariat, S.F., Youssef, R.F., Gupta, A., Chade, D.C., Karakiewicz, P.I., Isbarn, H., Jeldres, C., Sagalowsky, A.I., Ashfaq, R. & Lotan Y. (2010). Association of angiogenesis related markers with bladder cancer outcomes and other molecular markers. *The Journal of Urology*, 183(5), 1744–1750. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: [http://www.jurology.com/article/S0022-5347\(10\)00019-4/abstract](http://www.jurology.com/article/S0022-5347(10)00019-4/abstract)
- Shawver, L.K., Slamon, D. & Ullrich, A. (2002). Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell*, 1, 117–123. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: http://ac.els-cdn.com/S1535610802000399/1-s2.0-S1535610802000399-main.pdf?_tid=6dc3f0ea-3157-11e6-bbc2-00000aacb361&acdnat=1465816405_9fcfe37f63e989e5f0acb9518db6c4f0
- Shields, J.D., Kourtis, I.C., Tomei, A.A., Roberts, J.M. & Swartz, M.A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328, 749–752. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/328/5979/749.long>
- Singh, R.K., Gutman, M., Bucana, C.D., Sanchez, R., Llansa, N. & Fidler, I.J. (1995). Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4562–4566. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41984/>
- Skipper, H.E., Schabel, F.M. Jr, Mellett, L.B., Montgomery, J.A., Wilkoff, L.J., Lloyd, H.H. & Brockman, R.W. (1970). Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemotherapy Reports*, 54, 431–450.
- Stankiewicz, A., Skrzydlewska, E. & Makiela, M. (2002). Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 19(2), 67–82.
- Subramaniam, S.R., Cader, R.A., Mohd, R., Yen, K.W. & Ghafor, H.A. (2013). Low-dose cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity. *American Journal of Case Reports*, 14, 345-349. Acedido em Jan. 13, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3767583/>

- Sugumar, E., Kanakasabapathy, I. & Abraham, P. (2007). Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage and increased oxidative stress in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. *Clinica Chimica Acta*, 376, 244–245. Acedido em Mar. 10, 2016, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898106002324>
- Snyder, L.S., Heigh, R.I. & Anderson, M.L. (1993). Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in a patient with Wegener's granulomatosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 68(12), 1203–1204. Acedido em Mar. 10, 2016, disponível em: [http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(12\)60074-3/pdf](http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(12)60074-3/pdf)
- Tomoe, H. (2015). In what type of interstitial cystitis/bladder pain syndrome is DMSO intravesical instillation therapy effective? *Translational andrology and urology*, 4(6), 600–604. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4708538/>
- Tripp, C.D., Fidel, J., Anderson, C.L., Patrick, M., Pratt, C., Sellon, R. & Bryan, J.N. (2011). Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 278–284. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.0684.x/abstract>
- Trumpatori, B.J. & Lascelles, B.D.X. Relief of chronic cancer pain. In J.M. Dobson & B.D.X. Lascelles (Eds), *BSAVA manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp. 121–123) Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Umansky, V. & Sevko, A. (2013). Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenvironment*, 6, 169–177. Acedido em Dez. 15, 2015, disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717060/pdf/12307_2012_Article_126.pdf
- Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2010). Hematopoietic tumours in dogs. In: D.M., Vail (Eds.) *The textbook of veterinary internal medicine* (7th ed.) (pp 2148–2162.). St Louis: Saunders Elsevier.
- Vives, M., Ginestà, M.M., Gracova, K., Graupera, M., Casanovas, O., Capellà, G., Serrano, T., Laquente, B. & Viñals, F. (2013). Metronomic chemotherapy following the maximum tolerated dose is an effective anti-tumour therapy affecting angiogenesis, tumour dissemination and cancer stem cells. *Internacional Journal of Cancer*, 133, 2464–2472. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.readcube.com/articles/10.1002/ijc.28259>
- Vail, D. M. (2009). Supporting the veterinary cancer patient on chemotherapy: neutropenia and gastrointestinal toxicity. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24(3), 122–129. Acedido em Jan. 20, 2015, disponível em: [http://www.companimalmed.com/article/S1938-9736\(09\)00015-4/abstract](http://www.companimalmed.com/article/S1938-9736(09)00015-4/abstract)
- Volpert, O.V., Dameron, K.M. & Bouck, N. (1997). Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene*, 14(12), 1495–15027. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/v14/n12/abs/1200977a.html>

- Warry, E., Hansen, R.J., Gustafson, D.L. & Lana, S.E. (2011). Pharmacokinetics of cyclophosphamide after oral and intravenous administration to dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 903–908. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.0730.x/epdf>
- Withrow, S.J. (2007). Why worry about cancer in pets?. In S.J. Withrow & D.M. Vail (Eds.) *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. (4th ed.). Missouri: Saunders.
- Withrow, S.J., Dail, D.M. & Page, R. L. (2013). Why Worry About Cancer in Companion Animals? In S.J. Withrow, D.M. Dail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. (5th ed.). Missouri: Saunders.
- Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. & Underwood, P.A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(17), 10079-10086. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://www.jbc.org/content/271/17/10079.long>
- Yang, L., Pang, Y. & Moses, H.L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, 31, 220–227. Acedido em Nov. 12, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891151/>
- Yang, Z., Zhang, B., Li, D., Lv, M., Huang, C., Shen, G.X. & Huang, B. (2010). Mast cells mobilize myeloid-derived suppressor cells and Treg cells in tumor microenvironment via IL-17 pathway in murine hepatocarcinoma model. *PLoS ONE*, 5(1), e8922. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008922>
- Yap, R., Veliceasa, D., Emmenegger, U., Kerbel, R.S., McKay, L.M., Henkin, J. & Volpert, O.V. (2005). Metronomic low-dose chemotherapy boosts CD95-dependent antiangiogenic effect of the thrombospondin peptide ABT-510: a complementation antiangiogenic strategy. *Clinical Cancer Research*, 11, 6678–6685. Acedido em Nov. 10, 2015, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/18/6678.long>
- Zhao, D., Jiang, L., Hahn, E.W. & Mason, R.P. (2005). Continuous low-dose (metronomic) chemotherapy on rat prostate tumors evaluated using MRI in vivo and comparison with histology. *Neoplasia*, 7, 678–687. Acedido em Fev. 10, 2016, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1501423/>

ANEXOS

Anexo 1 - Comunicação em painel realizada no XII Congresso Hospital Veterinário Montenegro – Oncologia Sem Segredos

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE HEMATOPOIÉTICA, RENAL E HEPÁTICA DEVIDA A QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA COM CICLOFOSFAMIDA



HVB Hospital Veterinário Berna

Sá, A.^{a,c}; Gaspar, T.B.^a; Felisberto, R.^a; São Braz, B.^b; Henriques, J.^a

^aHospital Veterinário Berna - OneVet Group, Lisboa, Portugal
^bCITA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal
^cFaculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal

anna.sae@gmail.com



Oncologia sem segredos



U LISBOA

Introdução

A quimioterapia metronómica (QM) é definida pela administração contínua de baixas doses de fármacos citotóxicos, com curtos intervalos de tempo entre administrações.

Devido à utilização desta posologia a QM raramente surge relacionada com a presença de efeitos secundários graves, estando também associada a baixas toxicidade hematopoiética, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. No entanto, existem poucos estudos sobre a relação entre protocolos de QM e a eventual toxicidade produzida em animais de companhia.



Dos fármacos usados em QM, a ciclofosfamida (CIC) é o mais estudado atualmente, sendo administrado, por via oral, em doses entre 7 e 25 mg/m², uma vez por dia, tanto em monoterapia, como em terapia combinada.

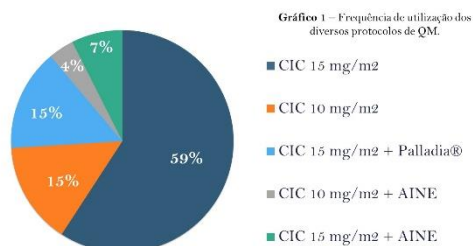
Objetivo

Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade hematopoiética, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade associadas à QM com CIC em cães e gatos, diagnosticados com neoplasias malignas.

Metodologia

Foram analisados 27 animais, 8 gatos e 19 cães, dos quais 52% (14/27) apresentavam metástases nos linfonodos regionais ou à distância [47,4% (9/19) dos cães e 62,5% (5/8) dos gatos].

Os dados foram recolhidos de forma retrospectiva, de março de 2014 a outubro de 2015. Os protocolos e respetivas frequências de utilização, estão descritos no gráfico 1.



A média de duração do tratamento foi de 111 dias em cães e de 112 dias em gatos.

A identificação de toxicidade hematopoiética foi realizada através da avaliação do hemograma; a nefrotoxicidade pelos níveis de creatinina plasmática e a hepatotoxicidade através dos níveis séricos da enzima alanina aminotransferase (ALT).

A classificação dos efeitos secundários foi efetuada de acordo com o descrito no *Veterinary Cooperative Group – Common Terminology Criteria for Adverse Events v1.1 (VCOG-CTCAE)*.

Resultados

Verificou-se que 13 animais (3 gatos e 10 cães) apresentaram pelo menos um episódio de toxicidade, o que corresponde a 48% da amostra.

Em 7 dos 10 cães observou-se a ocorrência de mais do que um evento de toxicidade em simultâneo, o que corresponde a um total de 21 eventos em toda a amostra.

Tabela 1 – Tipo de toxicidade observada e classificação segundo o VCOG-CTCAE

Tipo de toxicidade	Hematopoiética	Renal	Hepática
Nº de animais	9	6	6
Grau de toxicidade	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Nº de episódios	57% (13/21)	28,6% (6/21)	14,3% (2/21)

No caso da toxicidade hematopoiética, a anemia foi o efeito secundário mais observado (87,5%), em toda a amostra.

Observou-se ainda uma maior tendência para a nefrotoxicidade nos gatos e para toxicidade hematopoiética nos cães (75% e 44% dos episódios respetivamente).

Não se verificou existência de associação entre a ocorrência de toxicidade e o protocolo de QM utilizado, nem entre a ocorrência de toxicidade e a existência de metástases ($p=0,377$ e $p=0,180$, respetivamente).

Conclusão

Este estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente pelo seu caráter retrospectivo, pelo tamanho reduzido da amostra, pelas diferentes neoplasias ocorridas e pela utilização de diferentes protocolos de QM.

Ainda assim, pode concluir-se que a QM com CIC não é isenta de toxicidade, uma vez que cerca de metade dos animais da amostra, apresentaram pelo menos um evento de toxicidade. Contudo, verificou-se que a maioria dos eventos foram classificados como grau 1 de toxicidade, o que sugere que a tolerância da CIC em QM parece ser uma opção bem tolerada por cães e gatos com neoplasias malignas.

Considera-se assim importante que sejam realizados mais estudos prospetivos, nos quais sejam utilizados protocolos de QM com CIC, que corroborem estes resultados.

Bibliografia

1. Chin et al - (2007). Cancer chemotherapy. In Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology (4th Ed.).
2. Kerbel - (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. Nature review cancer, 4, 423-436;
3. Leo et al - (2013). Evaluation of low-dose metronomic cyclophosphamide toxicity in cats with malignant neoplasia. J of Feline Med and Surg, 201X, Vol. XX(X) 1-8;
4. Mutsaers, A.J. (2009). Metronomic chemotherapy. Topics in Companion Animal Medicine, 24 (3), 197-193;
5. Pasquier et al. Metronomic Chemotherapy: new rationale for new directions. Nat Rev Clin Oncol., 7:455-463.

Anexo 2 - Descrição dos dois casos clínicos de Cistite Hemorrágica Estéril

No caso da cadela que desenvolveu CHE classificada em grau 3, foram realizadas inicialmente duas ecografias: a primeira (imagem 1), no início de novembro de 2014 (cerca de 1 mês após início da QM) devido à manifestação de polaquiúria intensa e hematúria, que revelou um ligeiro espessamento da bexiga; e a segunda, no início de março de 2015, após queixas de cansaço, náuseas e desconforto abdominal, que mostrou que se mantinha o mesmo ligeiro espessamento da parede vesical. Em maio de 2015, foi realizada nova ecografia devido à presença de sinais de hematúria, polaquiúria, mas adicionalmente disúria e estrangúria. Aqui, a parede da bexiga apresentava-se com um espessamento superior ao encontrado anteriormente, de cerca de 1 cm, não havendo qualquer outra alteração ecográfica (imagem 2).

Imagem 1 – Imagem ecográfica da bexiga da doente com um espessamento de cerca de 2 mm.

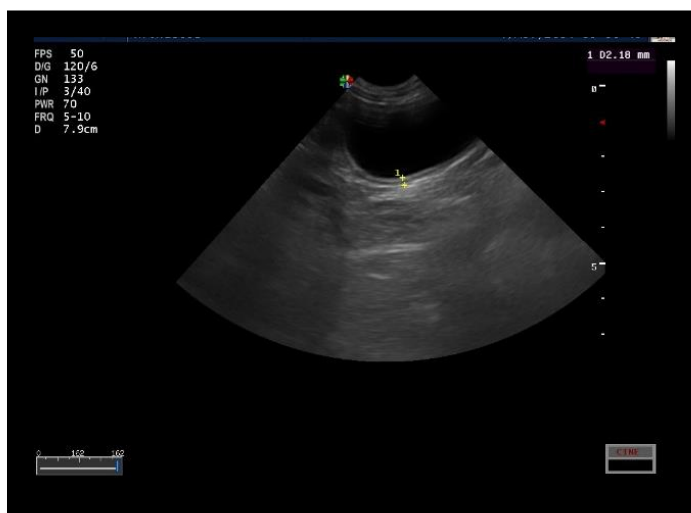


Imagem 2 – Imagem ecográfica da bexiga da doente com um espessamento de cerca de 1 cm.



Devido a estes achados, prescreveu-se cloridrato de flavoxato (Urispás®), 1 comprimido, PO, BID, e enrofloxacina (5 mg/kg, PO, SID) e realizou-se cultura da urina, mas, como ao fim de uma semana, a sintomatologia se manteve, realizou-se uma uretrocistoscopia (imagens 3 e 4). Este exame permitiu confirmar a presença de cistite hemorrágica estéril, ao permitir visualizar erosões hemorrágicas, descamação e hiperplasia da mucosa vesical, sobretudo na região apical da bexiga. A QM foi descontinuada nesta cadela, cerca de 3 meses após a manifestação dos primeiros sinais.

Imagem 3 - Imagem obtida por uretrocistoscopia, na qual se observa a mucosa vesical com sinais de hiperplasia, descamação e erosões hemorrágicas, compatíveis com o diagnóstico de cistite hemorrágica.

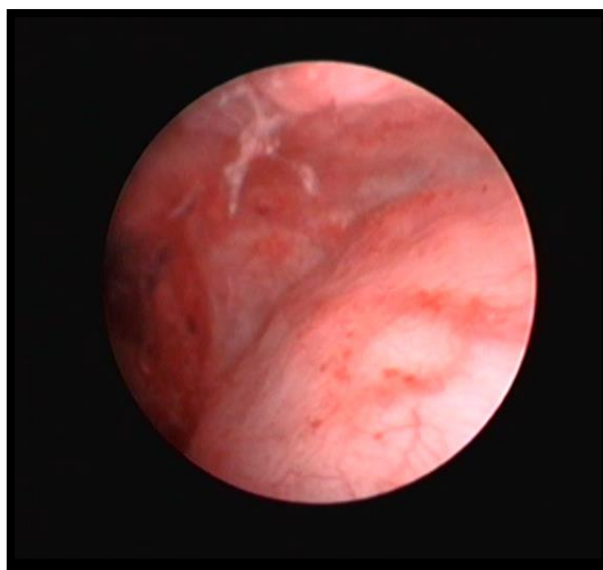
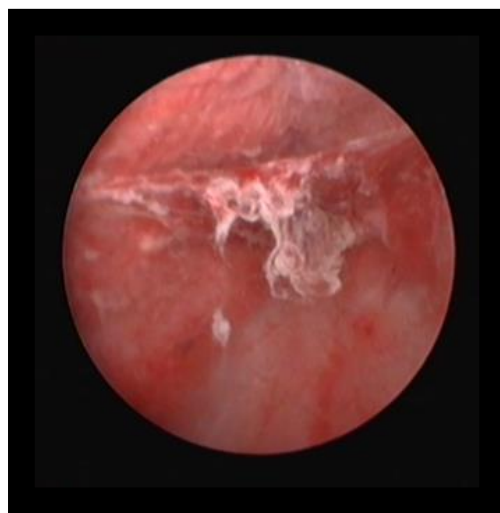


Imagem 4 - Imagem obtida por uretrocistoscopia em que se visualiza a região apical da bexiga com alterações mais exuberantes



A terapêutica inicialmente instituída consistiu em anti-inflamatório (firocoxib), protetores do trato gastro-intestinal (omeprazol e sucralfato), compostos de apoio à função do trato urinário (Cystaid®, Urispás® e dieta renal), e analgésicos (buprenorfina e tramadol). No entanto, apesar de durante duas semanas esta abordagem terapêutica ter amenizado a sintomatologia, ao fim desse tempo voltaram a manifestar-se os mesmos sinais.

Na ausência de resposta clínica e devido ao agravamento dos sinais clínicos, optou-se por estabelecer um novo plano que consistiu em fluidoterapia intensa, proteção gastrointestinal e vesical, e aplicação de dimetilsulfóxido (DMSO) intravesical. Para além disto instituiu-se ainda antibioterapia preventiva (enrofloxacina), terapia anti-inflamatória (succinato sódico de metilprednisolona) e analgésica (metadona).

O procedimento de lavagens vesicais com DMSO contemplou os seguintes passos e foi realizado duas vezes, com um intervalo de sete dias entre os dois procedimentos: i) Lavagem com NaCl a 0,9%; ii) Instilação de metilprednisolona (1 mg/kg) e metadona (0,5 mg/kg) diluídos em 10 mL de NaCl 0,9%; iii) Deixar atuar durante 10 minutos; iv) Instilação de DMSO a 30%; v) Deixar atuar durante 10 minutos; vi) Retirar o conteúdo e fazer lavagens com NaCl 0,9%.

Após a segunda aplicação intravesical de DMSO, verificou-se que praticamente toda a sintomatologia havia desaparecido (cerca de 90 dias depois).

Relativamente à outra cadela, cujo efeito secundário foi classificado em grau 2, a sintomatologia surgiu cerca de 50 dias após o início da QM, sendo o principal sinal apresentado a hematúria. A abordagem inicial a este caso foi a realização de uma ecografia, que revelou um ligeiro espessamento da parede cranial da bexiga (4mm), não existindo outras alterações

ecográficas. Realizou-se ainda cistocentese para exame completo de urina, com cultura e antibiograma. Porém, na cultura não se isolou nenhum microorganismo; no estudo de sedimento observaram-se numerosos eritrócitos (mais de 100 por campo de observação de 400x), a presença escassa de células inflamatórias (em média 3 por campo de observação de 400x), e células epiteliais de descamação dispersas, não tendo sido observados cristais, bactérias nem células com atipias. Com todos estes achados em conjunto com a ecografia e os sinais apresentados, conclui-se que se tratava de CHE devido à ciclofosfamida, que foi desta forma descontinuada. A terapêutica instituída consistiu em apoio à função do trato urinário (Cystocure®), protetores do trato gastro-intestinal (omeprazol e sucralfato) e antibioterapia preventiva.

No entanto, apesar de numa fase inicial a sintomatologia se ter atenuado, esta voltou a manifestar-se e manteve-se durante um mês, aproximadamente. Assim, no período referido voltou a verificar-se a presença de hematúria intensa (imagem 5), tendo-se realizado por isso nova ecografia, que revelou um espessamento da parede vesical de 8 mm, não se verificando mais nenhuma anomalia ecográfica. Também se realizou nova cistocentese para exame completo de urina, cultura e antibiograma, que revelaram resultados semelhantes aos anteriores (cultura negativa), e ainda análises sanguíneas. Como nas análises se verificou a existência de alterações nos valores de creatinina e ureia (2,7 mg/dL e 125 mg/dL, respetivamente), a doente ficou internada para realização de fluidoterapia, tendo sido também acrescentada medicação para a insuficiência renal aguda apresentada (Vetpril®, Lesperim®, Wenefro® e dieta renal), mantendo-se a restante terapêutica (Cystocure®, omeprazol e sucralfato e antibioterapia preventiva). Após 24h de fluidoterapia, o valor de creatinina sérica baixou para 1,1 mg/dL. Durante o internamento a urina voltou à coloração normal e na consulta de seguimento realizada, a urina mantinha-se sem alterações, pelo que se considerou neste momento, que a CHE estava ultrapassada (cerca de 46 dias depois).

Imagem 5 – Hematúria da cadela com CHE, grau 2.

